

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN**

**Scienze Veterinarie**

**Ciclo XXVII**

**Settore Concorsuale di afferenza: 07/H3 – MALATTIE INFETTIVE E  
PARASSITARIE DEGLI ANIMALI**

**Settore Scientifico disciplinare: VET/06 – PARASSITOLOGIA E MALATTIE  
PARASSITARIE DEGLI ANIMALI**

**TITOLO TESI**

**VARIABILITA' ED EVOLUZIONE DEI PRIONI: MUTABILITA' *IN VITRO***

**Presentata da: ILARIA VANNI**

**Coordinatore Dottorato**

**Prof. CARLO TAMANINI**

**Relatore**

**Prof. GIOVANNI POGLAYEN**

**Correlatore**

**Dott. ROMOLO NONNO**

**Esame finale anno 2015**

## INDICE

<b>RIASSUNTO</b>	1
<b>ABSTRACT</b>	2
<b>1. INTRODUZIONE</b>	3
1.1. EST: Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili	3
1.2. Protein-only hypothesis e meccanismo patogenetico	5
1.3. PrP <sup>C</sup> e PrP <sup>Sc</sup>	7
1.4. Ceppi di EST	8
1.5. Barriera di specie vs barriera di trasmissione	10
1.6. Conformational-selection hypothesis	11
1.7. Variabilità dei ceppi	12
1.8. Quasi-specie e Potenziale Evolutivo dei prioni	13
1.9. PMCA (Protein Misfolding Cyclic Amplification)	14
<b>2. OBIETTIVO DELLA TESI</b>	17
<b>3. MATERIALI E METODI</b>	18
3.1. Substrati	18
3.2. Inoculi	18
3.3. Esperimenti di Protein Misfolding Cyclic Amplification	18
3.3.1. Replicazione eterologa	18
3.3.2. Replicazione omologa	19
3.3.3. Replicazione in presenza di composti ad azione anti-prionica	19
3.4. Analisi biochimica per la caratterizzazione della PrP <sup>Sc</sup> dopo amplificazione in PMCA	20
3.4.1. Digestione con PK ed Epitope Mapping	20
3.4.2. Conformational Stability Assay	21
3.4.3. Western Blot discriminatorio modificato	21
3.4.4. Calcolo del Fattore di Amplificazione	22
3.5. Caratterizzazione biologica della PrP <sup>Sc</sup> amplificata in PMCA e dell'isolato naturale di Scrapie	23
3.5.1. Esperimenti di trasmissione	23
3.5.2. Analisi istopatologica	23
<b>4. RISULTATI</b>	24
4.1. Isolamento e caratterizzazione di un mutante conformazionale derivato dalla Scrapie ovina	24

4.1.1. Tasso di amplificazione <i>in vitro</i>	26
4.1.2. Caratterizzazione biochimica della PrP <sup>Sc</sup> di 18K e 14K	27
4.1.2.1. Epitope mapping della PrP <sup>res</sup>	27
4.1.2.2. Conformational Stability Assay	28
4.1.3. Caratterizzazione biologica della PrP <sup>Sc</sup> di 18K e 14K	28
4.1.3.1. Trasmissione in arvicole dell'isolato naturale ovino di Scrapie classica	28
4.1.3.2. Trasmissione in arvicole del prodotto di 18K derivato da replicazione in PMCA	30
4.1.3.3. Trasmissione in arvicole del prodotto di 14K derivato da replicazione in PMCA	31
4.2. Mutabilità come proprietà intrinseca dei prioni: identificazione di mutanti conformazionali in assenza di agenti di selezione	35
4.2.1. Set up sperimentale	35
4.2.2. Evoluzione del ceppo di BSE in replicazioni omologhe	37
4.2.3. Evoluzione del ceppo di Scrapie in replicazioni omologhe	38
4.3. Mutabilità dei prioni in risposta a molecole terapeutiche: PMCA come tecnica discriminatoria per molecole ad azione anti-prionica	44
4.3.1. Set up sperimentale	44
4.3.2. Identificazione delle molecole ad azione inibitoria in PMCA	45
4.3.2.1. SM54, SM74 e SM84	45
4.3.2.2. Congo Rosso, Clorpromazina e DS26	46
4.3.2.3. Tetrapirrolo e Bnf	46
<b>5. DISCUSSIONE</b>	51
<b>6. CONCLUSIONI</b>	58
<b>PUBBLICAZIONI</b>	60
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	60
<b>RINGRAZIAMENTI</b>	73

## RIASSUNTO

I prioni, privi di acidi nucleici, esistono come ceppi e possono mutare, in particolare quando attraversano una barriera di specie. Numerosi studi convergono sulla conclusione che le caratteristiche ceppo-specifiche siano iscritte nella conformazione della PrP<sup>Sc</sup>, con la variabilità di ceppo associata a varianti conformazionali della PrP<sup>Sc</sup>.

In questo studio ci siamo avvalsi del PMCA, tecnica che riproduce *in vitro* molti aspetti della biologia dei prioni, per mettere a punto condizioni sperimentali di replicazione che permettessero di osservare fenomeni di mutazione e selezione, onde investigare i meccanismi molecolari e di popolazione alla base della mutabilità dei prioni. In condizioni di replicazione eterologa, che mima la trasmissione tra diverse specie, è stato inizialmente possibile identificare un mutante difettivo della scrapie, caratterizzato da una diversa conformazione della PrP<sup>Sc</sup> e capace di replicare *in vitro* ma non più *in vivo*. Le condizioni in cui tale mutante è emerso hanno permesso di sviluppare ulteriori ipotesi di lavoro, basate sul concetto della quasi-specie. Impartendo diversi regimi di replicazione e seguendo l'evoluzione di due ceppi, è stato possibile evidenziare fenomeni di mutazione anche in condizioni di replicazione omologa, in assenza di forti pressioni selettive. In entrambi i ceppi sono emerse varianti conformazionali di PrP<sup>Sc</sup> durante passaggi replicativi ad ampia popolazione, mentre le popolazioni sottoposte a ripetuti colli di bottiglia hanno mostrato un rapido declino del tasso di replicazione. Sono stati infine investigati l'efficacia e il potenziale mutageno di molecole anti-prioniche, ottenendo importanti risultati preliminari sull'efficacia di molecole che legano la PrP<sup>C</sup>.

Questi risultati evidenziano come la mutabilità sia una caratteristica intrinseca dei prioni e supportano l'idea che i prioni siano molto variabili, similmente alle quasi-specie virali, e perciò adattabili e pronti a fenomeni di mutazione e selezione. Tali conclusioni hanno impatto su problematiche sanitarie quali lo studio del potenziale zoonotico e i fenomeni di farmaco-resistenza dei prioni.

**Parole chiave:** encefalopatie spongiformi trasmissibili, prione, PrP<sup>Sc</sup>, ceppi, mutabilità, PMCA, quasi-specie, arvicola rossastra, western blotting.

## ABSTRACT

Despite the absence of a nucleic acid encoding the genetic information, prions exist as strains, that are characterized by distinctive biochemical and biological features and are able to mutate, mostly during inter-species transmissions. It is now widely accepted that different strains are associated with different PrP<sup>Sc</sup> conformations and that the strain variation is due to modification of PrP<sup>Sc</sup> conformation.

Taking advantage of PMCA, an *in vitro* technique that reproduces several aspects of prion biology, we developed an *in vitro* set-up to mimic prion strain mutation and selection and to investigate the molecular mechanisms underlying prion mutability.

During heterologous PMCA replications, i.e. that mimic inter-species transmission, a defective scrapie mutant, characterized by a different PrP<sup>Sc</sup> conformation and able to replicate *in vitro* but not *in vivo*, was identified. The fact that the defective mutant arose only from an highly diluted inoculum, resembling the emergence of defective genotypes in viral quasi-species population after subsequent plaque-to-plaque transfers or bottleneck events, led us to evaluate prion ability to mutate during homologous PMCA replications and without selective pressure, only submitting prion strains to different passage regimens. In both strains, PrP<sup>Sc</sup> conformational variants were identified only after large population passages, while repeated bottleneck events caused a rapid decline in amplification rates. Lastly, we evaluate the ability of some anti-prion compounds to inhibit PrP<sup>Sc</sup> *in vitro* amplification and their potential role in inducing drug-resistant prions, pointing out the worth use of PrP<sup>C</sup> as a therapy target.

The data support the view that mutability is an intrinsic property of prions and that prions constitute quasi-species populations subjected to mutation and selective amplification, thus able to change their “phenotype” in response to changes in the environment. These findings have obvious significant implications in public health, raising concern about the real zoonotic potential of prion strains and TSE therapeutic approaches.

**Key words:** transmissible spongiform encephalopathies, prions, PrP<sup>Sc</sup>, strains, mutability, PMCA, quasi-species, bank vole, western blotting.

## 1. INTRODUZIONE

### 1.1. EST: Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili

Le Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili (EST), o più comunemente malattie da prioni, sono un gruppo di malattie neurodegenerative trasmissibili e ad esito inevitabilmente fatale, riscontrate tanto nell'uomo quanto in diverse specie animali, selvatiche e domestiche.

Le EST sono malattie neurologiche progressive caratterizzate da lunghi periodi di incubazione e un largo spettro di manifestazioni cliniche, come cambiamenti del comportamento, atassia, assenza di coordinazione e iper-reattività agli stimoli. Le lesioni a carico del sistema nervoso centrale (SNC) comprendono degenerazione spongiosa a livello della sostanza grigia, vacuolizzazione, perdita neuronale e astrogliosi, ma l'entità delle lesioni può variare notevolmente; inoltre sono sempre assenti reazioni infiammatorie e/o immunitarie. La caratteristica patologica fondamentale è rappresentata dall'accumulo della isoforma patologica (PrP<sup>Sc</sup>) della proteina prionica (PrP<sup>C</sup>), una normale glicoproteina dell'ospite, ubiquitaria ed altamente conservata nelle diverse specie animali.

Le malattie da prioni sono classificate, sulla base della diversa eziologia, in i) forme acquisite, cioè originate da contatto diretto o indiretto con soggetti infetti; ii) forme ereditarie, dovute a mutazioni del gene PRNP codificante la proteina prionica; iii) forme idiopatiche o sporadiche, a origine sconosciuta. Nonostante la diversa origine, tutte le malattie da prioni risultano trasmissibili sperimentalmente.

Nell'uomo, nonostante l'enorme interesse suscitato dalle forme acquisite, le forme più frequenti di malattie da prioni sono quelle sporadiche; tra queste sono comprese la forma sporadica della malattia di Creutzfeldt-Jakob (sCJD), la forma sporadica dell'Insonnia Fatale (sFI) e la variably protease-sensitive prionopathy (VPSPr) (*Zou et al., 2010; Gambetti et al., 2011*). L'assenza di una causa conosciuta per la sCJD ha portato a formulare diverse ipotesi, prima tra tutte una spontanea conversione (transconformazione) della PrP<sup>C</sup> nella sua versione patologica (*Prusiner 1998*). Ipotesi alternative includono la presenza di mutazioni somatiche del gene della PrP (e per questo non ereditate), e l'acquisizione da fonti alimentari o ambientali ad oggi non identificate (*Gajdusek et al., 1977*).

Tra le forme umane acquisite vengono annoverati casi trasmessi accidentalmente per via iatrogena, a seguito di interventi di neurochirurgia o somministrazione di ormone

pituitario, gonadotropina e ormone della crescita derivati da donatori affetti, casi derivati dall'esposizione a cadaveri umani durante rituali cannibalistici come nel Kuru, o dall'esposizione probabilmente alimentare a materiale derivante da animali colpiti da Encefalopatia Spongiforme Bovina (BSE), come nella variante di Creutzfeldt-Jakob (vCJD) (*Scott et al., 1999*). L'evidenza di queste forme umane acquisite prova da un lato come le forme umane sporadiche, nonostante la natura spontanea, possano essere trasmesse in condizioni particolari, dall'altro come gli animali possano rappresentare una fonte di infezione umana. Questo ruolo di "reservoir" delle EST animali è stato lungamente sottostimato e/o sottovalutato fino al riconoscimento del potenziale zoonotico della BSE bovina, prima, e al momento, unica EST animale a comprovato rischio per l'uomo (*Scott et al., 1999*).

Pur essendo tutte causate da mutazioni nello stesso gene, le malattie da prioni ereditarie mostrano diverse caratteristiche clinico-patologiche che ne permettono la classificazione; tra queste troviamo la forma genetica della malattia di Creutzfeldt-Jakob (gCJD), la malattia di Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) e l'insonnia familiare fatale (FFI) (*Brown & Mastrianni 2010, Capellari 2011*). Inoltre, mentre alcune di queste risultano clinicamente e patologicamente indistinguibili dalle forme sporadiche, e vanno sotto il nome di gCJD, altre mostrano caratteristiche distintive quando sono associate a particolari mutazioni, come nel caso della GSS e FFI (*Bugiani et al., 2000, Parchi et al., 1998*).

Negli animali tra le forme acquisite vengono annoverate la Scrapie di ovini e caprini, l'Encefalopatia Spongiforme Bovina (BSE) dei bovini e la Chronic Wasting Disease (CWD) dei cervidi. La Scrapie e la CWD si comportano come malattie infettive, caratterizzate da una trasmissione che avviene per via orizzontale, tramite contatto diretto, ingestione di organi e tessuti infetti, o attraverso la contaminazione dell'ambiente. Al contrario, per la BSE dei bovini non è stata ad oggi riportata trasmissione nè orizzontale nè verticale, e la grande diffusione di BSE nel Regno Unito è stata causata principalmente dall'utilizzo di mangimi contenenti farine di carni infette. Tra le altre forme acquisite sono riportate l'Encefalopatia Spongiforme Felina (FSE), che colpisce felini sia domestici che selvatici, e l'Encefalopatia Trasmissibile del Visone (TME).

Tra le EST animali ad occorrenza apparentemente sporadica si trovano invece la Scrapie atipica o Nor98 negli ovi-caprini (*Benestad et al., 2008*) e le due forme recentemente descritte di BSE atipica nei bovini, BSE-H e BSE-L o BASE (*Biacabe et al., 2004; Casalone et al., 2004*).

La presenza di fattori genetici implicati nella suscettibilità a EST animali, come la Scrapie, è ormai nota da molti anni. Le specie appartenenti al sottordine Ruminantia posseggono infatti 105 diversi alleli del gene PRNP, generando 85 diverse varianti, che, così come accade per alcuni polimorfismi umani, determinano un diverso grado di suscettibilità o resistenza alla malattia dopo esposizione all'agente infettante (*Goldmann 2008*). Per quanto riguarda gli ovini, ad esempio, i polimorfismi più rilevanti nel determinismo genetico della scrapie sono quelli ai codoni 136, 154 e 171, dai quali derivano i cinque alleli ARQ, VRQ, AHQ, ARR, ARH e i 15 diversi genotipi risultanti, classificati in 5 diverse classi di rischio alla scrapie sulla base della sopravvivenza e dell'età di insorgenza dei sintomi di malattia in animali inoculati (*Goldmann 2008*).

## **1.2. Protein-only hypothesis e meccanismo patogenetico**

Una delle particolarità delle malattie da prioni è l'assenza di una risposta immunitaria dell'ospite e speculazioni riguardo la natura eziologica dell'agente patogeno crebbero notevolmente durante tutta la seconda metà del novecento. Inizialmente, la capacità dell'agente patogeno di trasmettersi ha fatto sì che questo venisse classificato come agente virale, mostrando tuttavia caratteristiche inusuali per un virus, come l'elevata resistenza al calore e al trattamento con formalina (*Pattison 1965*). La straordinaria resistenza all'inattivazione con radiazioni ionizzanti e ultraviolette riportata da Alper e colleghi (*Alper 1996*), le dimensioni incompatibili con quelle di un virus convenzionale e l'inattivazione con agenti caotropici, portarono alla nascita della "protein-only hypothesis", secondo cui l'agente patogeno è una proteina, o un set di proteine, presente nel corredo genetico dell'ospite, che solitamente non viene codificata o che non viene codificata in quella forma patologica, capace di trasmettersi tra animali diversi pur mantenendo una identità specie-specifica (*Griffith 1967*). Le sempre più numerose evidenze di un agente con proprietà che differivano da quelle di virus, viroidi o plasmidi, insieme alla mancata identificazione di un acido nucleico specifico per le EST, portarono nel 1982 Prusiner a riprendere l'ipotesi di Griffith ed introdurre il concetto di "prione" (acronimo di Proteinacious Infectious Particle), cioè un agente infettante di natura esclusivamente proteica e parzialmente resistente alla digestione con enzimi proteolitici (Proteinasi K), privo di acidi nucleici (*Prusiner 1982*). La successiva identificazione di una proteina insolubile e resistente alle proteasi nel cervello di animali malati (*Oesch et al., 1985*) ha ulteriormente corroborato tale ipotesi.



L'evento patogenetico principale, che sottende tutte le malattie da prioni, è la conversione post-traduzionale della proteina prionica cellulare ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ) in una isoforma patologica denominata  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  che si accumula nel sistema nervoso centrale in aggregati proteici di varie dimensioni o in forma di sostanza amiloide. Alla transconformazione è associato un cambiamento nelle proprietà biochimiche della proteina: mentre la  $\text{PrP}^{\text{C}}$  è solubile in detergenti non denaturanti, risulta rapidamente digerita dalle proteasi ed è ricca in  $\alpha$ -eliche, la  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  è insolubile in detergenti, parzialmente resistente alla proteolisi e principalmente costituita da  $\beta$ -foglietti (*Bolton et al., 1982; Meyer et al., 1986; Pan et al., 1993*). Ad oggi, il rinvenimento di frammenti di PrP resistenti alle proteasi ( $\text{PrP}^{\text{res}}$ ) in omogenati tissutali rappresenta l'unico saggio diagnostico disponibile per la diagnosi molecolare delle malattie da prioni.

La teoria del prione postula che la  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  sia il principale, se non l'unico, componente dell'agente infettante, e che l'evento chiave della patologia sia la transconformazione (spontanea, favorita da alcune mutazioni del gene PRNP o indotta da molecole di  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  esogene) della  $\text{PrP}^{\text{C}}$  dell'ospite in  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ . Il nucleo di  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  neoformato sarebbe poi in grado di replicarsi in un processo autocatalitico reclutando e convertendo altre molecole di  $\text{PrP}^{\text{C}}$ . Tale teoria ha trovato numerose conferme sperimentali, non ultima la descrizione dei prioni sintetici, ovvero la generazione di infettività a partire da PrP ricombinante purificata (*Legname et al., 2004; Wang et al., 2010*).

Due sono stati i modelli di conversione della  $\text{PrP}^{\text{C}}$  in  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  proposti: il "refolding model" e il "seeding o nucleation model". Secondo il "refolding model" la transconformazione della  $\text{PrP}^{\text{C}}$  in  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  sarebbe indotta dalla sola interazione con la  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ . L'interazione  $\text{PrP}^{\text{C}}$ - $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  determinerebbe dapprima la perdita della struttura terziaria nativa della  $\text{PrP}^{\text{C}}$  e successivamente la sua rinaturazione in  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ . Secondo questo modello di conversione infatti, le due isoforme sarebbero separate da una barriera costituita dall'energia di attivazione necessaria al cambiamento conformazionale, energia che in condizioni normali è sufficientemente elevata da impedire la conversione spontanea della isoforma nativa a quella patologica, e che viene ridotta dall'interazione  $\text{PrP}^{\text{C}}$ - $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ , permettendo quindi la transconformazione (*Prusiner 1991*). Il "seeding model" propone invece che la  $\text{PrP}^{\text{C}}$  sia usualmente in equilibrio con la  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  (o forse con un suo precursore), un equilibrio che in condizioni normali è fortemente spostato verso la  $\text{PrP}^{\text{C}}$ ; l'unione della  $\text{PrP}^{\text{C}}$  ad un "crystal-seed" o ad un aggregato di  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  determina la stabilizzazione della  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ , e la formazione di multimeri. La formazione dell'aggregato è rara ma, una volta formato, la successiva aggiunta di ulteriori monomeri avviene rapidamente (*Jarrett & Lansbury 1993*). Per

spiegare l'aumento esponenziale della PrP<sup>Sc</sup> e dei livelli di infettività durante l'infezione è stata anche postulata la possibile frammentazione degli aggregati di PrP<sup>Sc</sup> (Orgel 1996), in un processo che porta quindi all'aumento del numero di aggregati (e quindi dei "seed" di nucleazione) e che potremmo vedere come equivalente alla replicazione dell'agente eziologico (Prusiner et al., 1998).

### 1.3. PrP<sup>C</sup> e PrP<sup>Sc</sup>

La PrP<sup>C</sup>, la forma normalmente codificata dal gene PRNP, è una glicoproteina di membrana, principalmente localizzata sulla superficie esterna della membrana plasmatica attraverso un'ancora di glicosil-fosfatidil-inositolo (GPI), ubiquitaria e altamente conservata nei vertebrati. Essendo una proteina di secrezione, viene sintetizzata nel reticolo endoplasmatico e successivamente trasportata sulla membrana sinaptica (Orsi & Sitia 2007); durante il tragitto viene sottoposta a modifiche post-traduzionali quali il taglio del peptide segnale, l'attacco dell'ancora GPI sulla porzione C-terminale e l'aggiunta di zuccheri su due siti di N-glicosilazione sulla porzione C-terminale, cosa che determina l'esistenza di isoforme con due, una o nessuna ramificazione glucidica. Può essere rapidamente secreta grazie all'azione della fosfatidil-inositolo specifica fosfolipasi C (PIPLC) che riconosce e taglia l'ancora. E' inoltre estremamente suscettibile alla digestione con proteinasi K. Studi spettroscopici hanno permesso di determinarne la struttura secondaria e terziaria, mostrando come questa sia formata da una porzione flessibile e poco strutturata, N-terminale, e una porzione C-terminale, altamente strutturata, composta da 3 alfa eliche e 2 corti foglietti beta antiparalleli (Riek et al., 1996; Riek et al., 1997). Nonostante siano stati condotti numerosi studi atti a identificare la funzione fisiologica della proteina, usando diverse linee cellulari e modelli murini privati del gene che codifica la PrP<sup>C</sup> (PrP<sup>0/0</sup>) o in cui l'espressione della PrP<sup>C</sup> è up-regolata (Criado et al., 2005; Rial et al., 2012), il suo esatto ruolo fisiologico rimane elusivo. Studi recenti hanno indicato come la PrP<sup>C</sup> abbia numerose funzioni e sia implicata nella cognizione, apprendimento, ansia, locomozione, depressione e aggressività; ad ogni modo, l'esatto meccanismo biochimico e i pathways di trasduzione del segnale che coinvolgono la PrP<sup>C</sup> sono ancora lontani dall'essere chiariti (Massimino et al., 2013; Lobão-Soares et al., 2007; Steele et al., 2007).

Come detto in precedenza, la proteina prionica patologica, o PrP<sup>Sc</sup>, deriva dalla PrP<sup>C</sup> a seguito di modificazioni post-traduzionali, che consistono nel passaggio da una

conformazione proteica prevalentemente ad alfa eliche ad una in cui prevale l'organizzazione a foglietti beta, con una intrinseca tendenza a formare aggregati e strutture fibrillari che possono presentarsi sotto forma di depositi amiloidi (*Bolton 1982, Prusiner 1982*). Questa conversione conferisce alla PrP<sup>Sc</sup> caratteristiche biochimiche differenti dalla PrP<sup>C</sup>, tanto che inizialmente è stata definita come una forma di PrP largamente resistente alla digestione con proteinasi K (PK), in condizioni in cui la PrP<sup>C</sup> e molte altre proteine sono rapidamente degradate (*Meyer et al., 1986*). La digestione della PrP<sup>Sc</sup> con proteinasi K, ma non con altre proteasi, determina un taglio tra i residui amminoacidici 82-91 della sequenza matura, determinando il caratteristico pattern elettroforetico composto da tre bande corrispondenti alle specie di PrP<sup>res</sup> (cioè il frammento di PrP<sup>Sc</sup> resistente alla digestione con proteinasi K) di-, mono- e non-glicosilate. Ad ogni modo il concetto di “resistenza alle proteasi” è relativo, poiché anche la PrP<sup>Sc</sup> è suscettibile alla degradazione se trattata con alte dosi di PK e per lunghi tempi di incubazione (*McKinley et al., 1983*), e soprattutto il grado di resistenza alle proteasi può essere differente per differenti forme di PrP<sup>Sc</sup> (*Kuczius et al., 1999*). Alcune forme risultano infatti più suscettibili alla proteinasi K, ma non per questo non infettanti.

#### **1.4. Ceppi di EST**

Uno degli aspetti più controversi delle EST, e che meno si concilia con la natura esclusivamente proteica degli agenti eziologici, è l'esistenza di ceppi diversi di prioni. Si definisce ceppo un isolato infettivo che mostra specifiche caratteristiche biologiche e biochimiche che rimangono inalterate dopo trasmissioni seriali nella stessa specie.

La prima dimostrazione dell'esistenza di differenti ceppi di prioni è stata ad opera di Pattison e Millson nel 1961 (*Pattison & Millson 1961*), quando trasmissioni seriali in capra di un singolo caso di Scrapie ovina portarono alla comparsa di due distinti fenotipi di malattia, l'uno nel quale prevalevano sintomi eccitativi e cutanei, l'altro nel quale prevalevano sintomi di tipo depressivo, entrambi mantenuti costanti nei successivi passaggi in capra. Risultati simili sono stati ottenuti successivamente, quando passaggi seriali di diversi isolati di scrapie su topi inbred portarono all'isolamento di ceppi, che differivano tra loro e che mantenevano costanti le proprie caratteristiche quando re-inoculati nel topo (*Bruce & Fraser 1991*). I primi elementi in grado di conciliare la natura proteica delle malattie da prioni e la presenza di ceppi emersero da uno studio condotto su due ceppi della TME, la malattia da prioni del visone, ad opera di Bessen e Marsh. I due

ceppi infatti, oltre a diverse proprietà biologiche, mostravano differente sedimentazione in detergente, resistenza a digestione con proteinasi K e corsa elettroforetica, caratteristiche compatibili con una differente conformazione della proteina (*Bessen & Marsh 1992 e 1992b*).

Per definizione, i ceppi vengono distinti sulla base del tempo di incubazione e del profilo neuropatologico e clinico dopo trasmissione in un ospite, generalmente topo di laboratorio, e sulla capacità di trasmettersi in specie diverse (*Bruce 2003; Fraser & Dickinson 1973*). Recentemente però, questa tipizzazione biologica dei ceppi viene accompagnata da un approccio molecolare che permette di distinguere i ceppi anche sulla base delle differenti proprietà biochimiche della PrP<sup>Sc</sup>. La caratterizzazione biochimica dei ceppi si basa infatti sull'analisi delle caratteristiche elettroforetiche della PrP<sup>res</sup> (*Bessen & Marsh 1994*), sul profilo di glicosilazione della PrP<sup>res</sup>, cioè il rapporto quantitativo tra le sue forme glicosilate (di-, mono- e non-glicosilata) (*Hill et al., 2006*), sulla resistenza della PrP<sup>Sc</sup> alla digestione proteolitica (*Kuczius et al., 1999*), sull'analisi degli epitopi identificabili dopo digestione proteolitica (*Stack et al., 2002*), sul comportamento fisico-chimico della PrP<sup>Sc</sup> dopo denaturazione (*Safar et al., 1998; Jacobs et al., 2007; Pirisinu et al., 2010*).

Tutte queste evidenze confermano l'ipotesi postulata da Bessen e Marsh più di venti anni fa, secondo cui ogni ceppo è associato ad una differente isoforma di PrP<sup>Sc</sup>, capace di convertire la PrP<sup>C</sup> a sua somiglianza. L'idea che possano esistere dozzine di differenti conformazioni “stabili” di una proteina appare oggi meno bizzarra. Da un lato, infatti, sono ormai note numerose proteine che cambiano la propria conformazione, e conseguentemente la propria funzione, a seguito di uno stimolo (interazione con altre proteine e/o aggregati proteici, molecole segnale, variazioni di pH), solitamente implicate nella trasduzione del segnale. Dall'altro, proteine che esistono come aggregati, sia patologici ed eventualmente infettanti come PrP<sup>Sc</sup>, alfa-sinucleina, A-beta e SOD1 (*Ross & Poirier 2004*), sia fisiologici come i prioni di funghi e lieviti (*Wickner et al., 2015*), sono numerose; modifiche della struttura quaternaria di questi aggregati proteici possono quindi facilmente e comprensibilmente determinare modifiche conformazionali e così spiegare l'esistenza delle dozzine di differenti conformeri di PrP<sup>Sc</sup>. Su queste basi è stato coniato il concetto di “conformation templating”, la capacità cioè della PrP<sup>Sc</sup> di agire da template nella replicazione delle nascenti molecole di PrP<sup>Sc</sup> e la capacità della PrP<sup>C</sup> di acquisire fedelmente queste informazioni conformazionali della PrP<sup>Sc</sup>. Essendo quindi le strutture terziarie e/o quaternarie della PrP<sup>Sc</sup> a codificare le proprietà ceppo-specifiche dei ceppi, si è ipotizzato che distinti ceppi di prioni siano differenti conformeri di PrP<sup>Sc</sup>, ipotesi

corroborata da numerose evidenze sperimentali (*Telling et al., 1996, Caughey et al., 1999; Tanaka et al., 2004; King & Diaz-Avalos 2004*).

### **1.5. Barriera di specie vs barriera di trasmissione**

In condizioni “naturali” l'agente infettivo delle EST si trasmette principalmente attraverso ingestione di alimenti contaminati. In trasmissioni sperimentali, invece, la trasmissione è molto più efficiente quando l'agente infettivo è somministrato per via intracerebrale, piuttosto che per via periferica o addirittura orale. Allo stesso modo la trasmissione di una EST da una specie ad un'altra risulta solitamente meno efficiente (incremento del tempo di incubazione e/o decremento del numero di animali affetti) rispetto a quella tra animali della stessa specie, arrivando in alcuni casi ad essere addirittura impossibile; questo fenomeno ha dato origine al concetto di “barriera di specie”. In generale, la barriera di specie è operante durante il salto di specie, ma viene superata in successivi sottopassaggi nella nuova specie (di solito 2-3), a mostrare un adattamento del prione al suo nuovo ospite. La dimostrazione che le EST di criceto sono efficientemente trasmesse in topi transgenici esprimenti il gene PRNP di criceto, ma non in topi wild-type (*Scott et al., 1989*), ha confermato come questa barriera risieda essenzialmente nelle differenze tra la struttura primaria della PrP del donatore e del ricevente, cioè nella sequenza amminoacidica della PrP. Però, la barriera di specie non è sempre simmetrica. Ci sono casi in cui il prione non può essere trasmesso da una specie A alla specie B, ma la barriera è molto debole o addirittura inesistente se la trasmissione avviene dalla specie B alla specie A (*Kimberlin et al., 1978, 1987 e 1989*).

Nonostante l'importanza della struttura primaria della PrP, la capacità di trasmettersi da una specie ad un'altra può anche dipendere dal ceppo. La prova più evidente dell'importanza del ceppo per la trasmissione inter-specifica si è avuta studiando le EST umane. Infatti, mentre la sCJD classica è facilmente trasmissibile in topi transgenici esprimenti PrP umana ma non in topi wild-type, la vCJD, pur avendo una struttura primaria della PrP identica a quella della CJD classica mostra una capacità di trasmissione diametralmente opposta (*Hill et al., 1997*). L'evidenza che due ceppi che si propagano nello stesso ospite possano avere una barriera completamente diversa nei confronti di altre specie, ha portato a parlare di “barriera di trasmissione” piuttosto che barriera di specie (*Collinge 1999 e 2001*).

## 1.6. Conformational-selection hypothesis

Come detto, nonostante siano assenti precise informazioni riguardo la struttura tridimensionale della PrP<sup>Sc</sup>, molti studi suggeriscono che i ceppi di prioni siano associati a differenti conformazioni della PrP<sup>Sc</sup> (Peretz *et al.*, 2001 e 2002; Safar *et al.*, 1998). Chiaramente, il numero delle possibili diverse conformazioni sarà limitato dalla stabilità termodinamica della conformazione e dalla capacità di replicare a un tasso maggiore di quello della naturale clearance cellulare che avviene *in vivo*; questo numero costituirà il teorico portfolio di conformazioni permesse e patogeniche della PrP<sup>Sc</sup>. Tanaka e colleghi hanno fornito un elegante modello a descrizione dei ceppi dei prioni di lievito e di come la propensione alla frammentazione di un ceppo giochi un ruolo fondamentale per il suo fenotipo *in vivo* (Tanaka *et al.*, 2006). Per persistere i prioni di lievito devono propagarsi ad un tasso sufficientemente elevato da compensare l'effetto di diluizione dato dalla divisione cellulare. Questo significa che alcuni ceppi possono esistere “conformazionalmente” per una data sequenza di PrP ed essere sintetizzati, ma non possono essere propagati indefinitamente in un ospite a causa di un'efficiente clearance. Chiaramente, la situazione nei mammiferi è molto più complessa, in quanto le cellule infette sono principalmente cellule post-mitotiche, e i tipi cellulari coinvolti sono numerosi, così come i tessuti.

Utilizzando le conoscenze sui prioni dei lieviti e quelli dei mammiferi è stato proposto un modello capace di integrare il concetto di ceppo e barriera di specie con la protein-only hypothesis. Secondo tale modello (“conformational selection model”) sia i ceppi di prioni che la barriera di specie sono manifestazioni dello stesso fenomeno, cioè della capacità di una singola proteina di modificarsi in conformazioni multiple. In questo quadro, le possibili conformazioni di PrP<sup>Sc</sup> che la PrP<sup>C</sup> di una specie può assumere dipenderanno essenzialmente dalla struttura primaria della PrP<sup>C</sup>. In presenza di PrP<sup>Sc</sup> esogena proveniente da una specie diversa, l'infezione avrà luogo nella misura in cui la conformazione della PrP<sup>Sc</sup> esogena è permessa dalla struttura primaria della PrP<sup>C</sup> dell'ospite. L'entità della barriera di specie sarà perciò determinata dal grado di sovrapposizione tra le conformazioni favorite dall'ospite e dalla PrP<sup>Sc</sup> del donatore. Quindi, una trasmissione eterologa in cui la PrP<sup>Sc</sup> possiede una conformazione presente all'interno della gamma di conformazioni permesse dall'ospite manifesterà una bassa barriera di trasmissione. Se invece la conformazione è incompatibile, la barriera di

trasmissione sarà alta e superabile solo nel caso in cui emerga una nuova variante con una migliore compatibilità strutturale (*Collinge & Clarke 2007*). Un esempio che ben illustra il modello a selezione conformazionale è fornito dal polimorfismo M129V codificante metionina o valina al codone 129 della PrP umana, determinante chiave per la suscettibilità genetica alle malattie da prioni. Il genotipo M129 è presente in circa un terzo della popolazione sana, ma il 100% dei pazienti vCJD testati è risultato essere omozigote per tale allele (*Wadsworth et al., 2004*). Analisi successive condotte sulla PrP<sup>C</sup> M129 e PrP<sup>C</sup> V129 hanno mostrato come questo polimorfismo non influenzi né la conformazione, né la cinetica, né la stabilità della PrP<sup>C</sup>, suggerendo come probabilmente la PrP<sup>C</sup> V129 non sia in grado di adottare le conformazioni di PrP<sup>Sc</sup> associate con la BSE (*Hosszu et al., 2004*).

### **1.7. Variabilità dei ceppi**

Generalmente il fenotipo dei ceppi presente nella specie di origine viene mantenuto dopo trasmissioni seriali in modelli animali (*Collinge et al., 1996; Crozet et al., 2001; Sigurdson et al., 2006*). Nel caso in cui non si abbia il mantenimento del fenotipo, può accadere che la reinfezione della specie di origine o di topi esperimenti la sequenza di PrP della specie di origine ristabilisca il fenotipo originale, indicando quindi la conservazione delle proprietà del ceppo; alternativamente si ha la comparsa di un nuovo ceppo.

Il primo di numerosi esperimenti a prova della comparsa di nuovi ceppi in seguito a trasmissioni sperimentali è stato fornito dalla trasmissione di un isolato di Scrapie ovino in capre, che ha portato all'emergenza di due fenotipi diversi, mantenuti in passaggi successivi (*Dickinson 1976*). Di solito, il fenomeno della mutazione del ceppo avviene durante trasmissioni inter-specie, quando il ceppo non si riproduce fedelmente passando in un nuovo ospite e viene propagato un ceppo differente. Tuttavia, la mutazione può avvenire anche durante trasmissioni intra-specie, quando la sequenza primaria della PrP dell'ospite differisce da quella dell'inoculo, come nel caso del sopra citato polimorfismo M129V della PrP umana, così come quando ospite e donatore hanno identica PrP (*Asante 2002; Lloyd 2004*). Secondo il modello a selezione conformazionale, l'incapacità della PrP<sup>C</sup> dell'ospite di adattarsi alla conformazione della PrP<sup>Sc</sup> del donatore determinerebbe la selezione di un nuovo conformero di PrP<sup>Sc</sup>, e quindi la mutazione del ceppo, tanto in trasmissioni inter-specie che in quelle intra-specie. Due possibilità, non mutualmente esclusive, sono state immaginate per spiegare l'emergenza di questo nuovo conformero: i) il ceppo esiste come clone e la variazione di ceppo implica la generazione di un nuovo e diverso tipo di PrP<sup>Sc</sup>;

ii) il ceppo consiste di un insieme di specie molecolari, contenente un conformero di PrP<sup>Sc</sup> dominante riconosciuto in WB e preferenzialmente propagato nel suo ospite usuale, e sottospecie minoritarie che possono essere selezionate e propagate, perché favorite, in un ospite alternativo, determinando così una variazione di ceppo (*Collinge 2007*). Questa seconda ipotesi prevede che gli aggregati di PrP<sup>Sc</sup> abbiano un'intrinseca capacità di generare mutanti conformazionali durante il processo di replicazione, come spiegato più avanti. L'instabilità intrinseca di alcuni ceppi di prioni (*Bessen & Marsh 1994*), i numerosi ceppi isolati a partire da singoli isolati di Scrapie (*Kimberlin 1978; Yokoyama et al., 2010*), l'identificazione di differenti tipi di PrP<sup>Sc</sup> in singoli cervelli di pazienti CJD (*Polymenidou et al., 2005*) sono tutte evidenze che rendono più plausibile la seconda ipotesi.

### **1.8. Quasi-specie e Potenziale Evolutivo dei prioni**

Il modello che vede i ceppi di prioni composti da un insieme eterogeneo di differenti conformazioni di PrP<sup>Sc</sup>, mantenute sotto la pressione selettiva dell'ospite, prevede che questi stati conformazionali minoritari siano continuamente generati durante la replicazione dei prioni, e che siano preferenzialmente amplificati durante la trasmissione in un ospite con diversa sequenza di PrP o in un diverso tipo cellulare, portando così ad uno shift del ceppo. In quest'ottica, la stessa mutabilità sarebbe una proprietà intrinseca dei prioni.

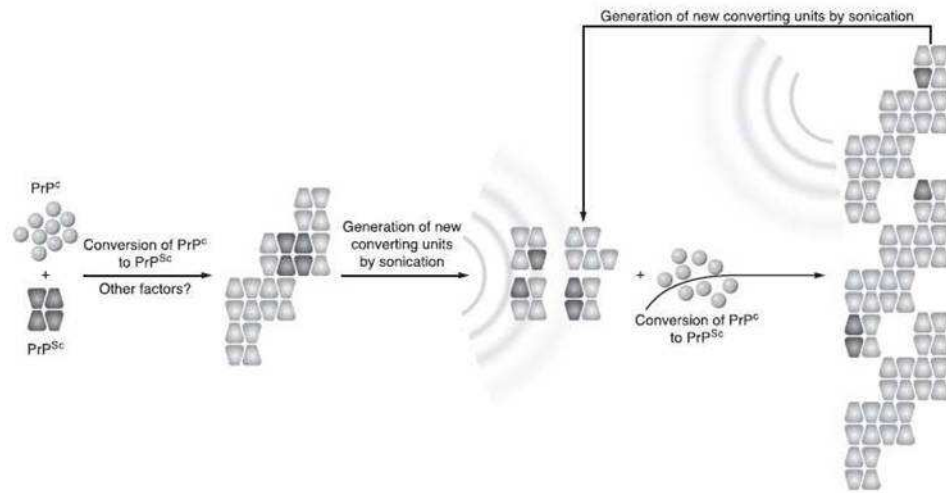
La messa a punto di saggi discriminativi basati sul tropismo cellulare e sulla suscettibilità a diverse molecole, come swansonina e kifunesine, ha creato nuove e importanti opportunità sperimentali, tra cui lo studio del potenziale evolutivo dei prioni (*Klohn et al., 2003; Mahal et al., 2007; Li et al., 2010*). Durante esperimenti *ex vivo* Charles Weissmann e collaboratori hanno dimostrato come alcuni ceppi murini possano modificare in maniera graduale le proprie caratteristiche quando trasferiti dal cervello a culture cellulari, ri-acquisendo il fenotipo originale dopo trasmissioni *in vivo*. Questo è il caso del ceppo 22L, che passa gradualmente dall'essere capace di infettare cellule R33 (R33-competente) e resistente all'inibitore di mannosidi II swansonina a R33-incompetente e sensibile alla swansonina quando propagato nella linea cellulare di neuroblastoma PK1. In modo analogo, la propagazione del ceppo 22L adattato alle cellule in presenza di swansonina nel terreno di coltura, determina l'emergenza di popolazioni resistenti all'inibitore, che vengono gradualmente perse con la rimozione dell'inibitore. La dimostrazione che queste varianti selezionate positivamente siano pre-esistenti nella popolazione iniziale come



sottopopolazioni minoritarie e selezionate, e non indotte, dalla swansonina (*Li et al., 2010*) suggerisce che i ceppi di prioni siano strutturati come una quasi-specie virale, cioè composti da una nuvola di varianti conformazionali, che vengono generate continuamente; quando cambia l'ambiente di replicazione, la variante che si replica più efficacemente nel nuovo ambiente diventerà la componente predominante della popolazione, costituendo così un distinto "sub-strain" o sottoceppo (*Collinge & Clarke 2007; Li et al., 2010; Weissmann 2011*). La capacità della quasi-specie di rispondere in modo veloce e reversibile all'ambiente viene spiegata considerando i diversi sub-strain come conformazioni di PrP<sup>Sc</sup> separate da una barriera di energia di attivazione bassa, che può essere facilmente superata in un particolare ambiente replicativo e sotto particolari condizioni fisiologiche. Di contro i ceppi di prioni sarebbero separati da una barriera di energia di attivazione molto elevata, rendendo così rara la conversione da un ceppo all'altro. Simili risultati sono stati ottenuti *in vitro*, sfruttando la tecnologia del PMCA (*Gonzalez-Montalban et al., 2013; Makarava et al., 2013*).

### **1.9. PMCA (Protein Misfolding Cyclic Amplification)**

Il Protein Misfolding Cyclic Amplification (PMCA), è una tecnica sviluppata per riprodurre *in vitro* il processo di replicazione dei prioni, che permette l'amplificazione esponenziale di esigue quantità di PrP<sup>Sc</sup> presenti in un campione (*Saborio et al., 2001*). La reazione di amplificazione avviene in due step, consecutivi e ciclici: il primo è uno step di incubazione, il secondo uno di sonicazione (Fig 1). Nel primo step una piccola quantità di PrP<sup>Sc</sup> (seed o inoculo), generalmente originata da omogenato cerebrale affetto da EST, è lasciata incubare in presenza di un eccesso di PrP<sup>C</sup>, derivante da omogenato cerebrale di un soggetto sano. Durante l'incubazione, i piccoli aggregati di PrP<sup>Sc</sup> reclutano molecole di PrP<sup>C</sup> e ne inducono la transconformazione a PrP<sup>Sc</sup>, formando così aggregati di dimensioni maggiori che continuano nel processo di reclutamento/transconformazione della PrP<sup>C</sup>. Nel secondo step della reazione, una breve sonicata viene utilizzata per frammentare gli aggregati di PrP<sup>Sc</sup> neoformati, generando quindi da ogni frammento un nuovo aggregato di PrP<sup>Sc</sup> che può agire da innesco per la successiva fase di incubazione, reclutando e



**Figura 1. Rappresentazione schematica del meccanismo di reazione del PMCA.** La PrP<sup>C</sup> viene reclutata da aggregati in crescita di PrP<sup>Sc</sup>. Subisce conseguentemente un cambiamento conformazionale e diventa PrP<sup>Sc</sup>. Durante la sonicazione, gli aggregati di PrP<sup>C</sup> e PrP<sup>Sc</sup> vengono distrutti generando nuove unità di conversione per il continuo reclutamento di PrP<sup>C</sup>. La PrP<sup>C</sup> è rappresentata da sfere in grigio chiaro, mentre il seed di PrP<sup>Sc</sup> originario da trapezi in grigio scuro. La PrP<sup>Sc</sup> neoformata è rappresentata da trapezi in grigio chiaro. Da Aguzzi, A. e Calella, AM, “Prions: Protein Aggregation and Infectious Diseases”, *Physiol Rev*, 2009.

transconformando altre molecole di PrP<sup>C</sup>. Così facendo, ad ogni ciclo aumenta il numero di seeds, accelerando in maniera esponenziale il processo di conversione della PrP<sup>C</sup> in PrP<sup>Sc</sup> (Fig. 1). La natura ciclica del PMCA permette che in pochi cicli possa essere amplificata una grande quantità di PrP<sup>Sc</sup>, rilevabile con le tradizionali tecniche di ELISA e Western Blotting, a partire da una diluizione di 10<sup>-12</sup> dell'inoculo originale, che contiene, secondo gli autori, il numero minimo di molecole presenti in una singola particella infettante (*Saa et al., 2006*). Si può quindi considerare il PMCA concettualmente analogo ad una amplificazione del DNA per PCR. Questa tecnologia è stata utilizzata largamente per investigare la natura dell'agente infettante e il suo intricato meccanismo di propagazione. In particolare, il PMCA non replica semplicemente il processo di transconformazione proteica, aumentando il numero di aggregati di PrP<sup>Sc</sup>, ma amplifica di pari passo l'infettività (*Saa et al., 2006*). In altri termini, il PMCA ha fornito ulteriori prove che gli agenti infettanti delle EST siano effettivamente gli aggregati di PrP<sup>Sc</sup>, essendo in grado di amplificare l'infettività in provette, ed in condizioni cell-free. Materiale infettante è stato generato in PMCA a partire da omogenati cerebrali, lisati cellulari, PrP<sup>C</sup> purificata ed addirittura PrP ricombinante prodotta in *E. coli* (*Mays et al., 2011; Deleault et al., 2007; Wang et al., 2010*). Studi per identificare i componenti sufficienti e necessari per permettere la replicazione dei prioni in PMCA hanno sottolineato l'importanza di cofattori

cellulari nella conversione della PrP<sup>C</sup>; ad oggi lipidi, poli-anioni (principalmente RNA) e PrP<sup>C</sup> sembrano essere i componenti essenziali per la produzione *in vitro* di PrP<sup>Sc</sup> con un titolo infettante pari a quello di prioni derivati da cervello (Supattapone 2010). Chiaramente, la capacità di rivelare anche quantità infinitesimali di PrP<sup>Sc</sup> tanto da omogenati cerebrali, quanto da diversi fluidi di animali infetti, tra cui il sangue di ovini (Thorne & Terry 2008), topi (Tattum et al., 2010) e cervi (Rubenstein et al., 2010), la saliva di ovini affetti da Scrapie (Maddison et al., 2010) e la saliva e le urine di cervi affetti da CWD (Haley et al., 2009), e dall'urina di pazienti affetti da vCJD (Moda et al., 2014), rende il PMCA una tecnica promettente per lo sviluppo di test diagnostici ante-mortem. Caratteristica fondamentale delle molecole di PrP<sup>Sc</sup> prodotte in PMCA è il mantenimento di numerose caratteristiche biologiche dei prioni. E' stato infatti dimostrato come questa sia infettante *in vivo* per diversi animali, tra cui criceti (Castilla et al., 2005), topi (Murayama et al., 2006), arvicole rossastre (Cosseddu et al., 2011; Di Bari et al., 2013), ovini, caprini e bovini (Soto et al., 2005), cervidi (Kurt et al., 2007). Oltre all'infettività, studi condotti su ceppi murini, umani (Castilla et al., 2008) e di cervo (Green et al., 2008) hanno mostrato come la PrP<sup>Sc</sup> originata *in vitro* possa mantenere inalterata anche la specificità di ceppo. Parallelamente, gli stessi studi hanno mostrato come sia possibile superare *in vitro* la barriera di specie, determinando la generazione di nuovi ceppi con nuove caratteristiche biochimiche e patologiche, e dimostrando come il ceppo generato *in vitro* si adatti al nuovo ospite in maniera del tutto simile a quella che accade *in vivo* per mezzo di trasmissioni serali (Castilla et al., 2008). La dimostrata correlazione tra suscettibilità dei numerosi genotipi ovini a differenti EST *in vivo* ed efficienza di conversione *in vitro* (Bucalossi et al., 2011), la capacità di riprodurre e confermare *in vitro* l'abilità della BSE, ma non della Scrapie, di transconformare la PrP<sup>C</sup> umana (Jones et al., 2009), rendono il PMCA un valido, veloce ed economico approccio allo studio della suscettibilità genetica degli ovi-caprini e del potenziale zoonotico di numerosi forme animali delle malattie da prioni (Fernandez-Borges et al., 2009; Levavasseur et al., 2014). Infine, la dimostrazione che cambiamenti nell'ambiente di replicazione *in vitro*, quali deplezione dell'RNA (Gonzalez-Montalban et al., 2013), deglicosilazione della PrP<sup>C</sup> (Makarava et al., 2013), modifiche nel grado di sililazione della PrP<sup>C</sup> (Katorcha et al., 2014), possano indurre un cambiamento nelle proprietà della PrP<sup>Sc</sup>, suggerisce non solo che i ceppi di prioni siano caratterizzati da una elevata plasticità conformazionale, ma anche che il PMCA possa essere sfruttato per lo studio della mutabilità dei ceppi anche in condizioni di replicazione omologa.

## 2. OBIETTIVO DELLA TESI

Lo studio della mutabilità dei ceppi ha avuto recentemente un nuovo impulso, a causa dell'impatto che questo fenomeno ha su importanti aspetti sanitari, quali lo studio delle barriere di specie e la resistenza ai farmaci anti-prionici. Le evidenze relative all'esistenza dei ceppi di Scrapie, e della loro capacità di mutare, sono a lungo state considerate la principale confutazione dell'ipotesi sulla natura proteica dei prioni. Oggi questi fenomeni sono però validamente incorporati all'interno della teoria prionica (natura proteica dei prioni), grazie alle evidenze che hanno mostrato un legame tra le proprietà di ceppo, inclusa la mutabilità, e le varianti conformazionali della PrP<sup>Sc</sup>. Questo contesto offre l'opportunità di studiare *in vitro*, in sistemi cell-free, i meccanismi di replicazione e mutazione dei prioni.

L'obiettivo di questa tesi è stato quindi di mettere a punto condizioni sperimentali di replicazione *in vitro* dei prioni che permettessero di osservare fenomeni di mutazione e selezione, e di sfruttare tale contesto sperimentale controllato per poter investigare i meccanismi molecolari alla base della mutabilità dei prioni

In definitiva, il lavoro si propone di rispondere a interrogativi quali: i) se è possibile evidenziare fenomeni di mutazione e selezione durante la replicazione *in vitro* dei prioni; ii) se è possibile identificare le mutazioni esclusivamente sulla base dell'analisi molecolare della PrP<sup>Sc</sup>; iii) e quali sono le condizioni sperimentali che favoriscono o sfavoriscono l'insorgenza di mutanti.

A questo scopo è stata valutata l'intrinseca mutabilità dei prioni durante repliche omologhe e in assenza di forti limiti selettivi, come mismatches nella sequenza primaria della PrP, modifiche della PrP<sup>C</sup> o del substrato di reazione di PMCA. Facendo riferimento alle metodologie per lo studio delle quasi-specie virali, è stato quindi esplorato il potenziale evolutivo di alcuni ceppi di prioni, sottoponendoli a differenti regimi di replicazione, cioè o propagati attraverso passaggi in cui la popolazione è ampia o attraverso ripetuti eventi a collo di bottiglia che prevedono una diminuzione della taglia della popolazione, e valutandone fitness e variazioni della conformazione della PrP<sup>Sc</sup>. Infine, è stato impostato un saggio in PMCA capace di discriminare molecole ad azione anti-prionica e verificare l'induzione di eventi di mutazione e selezione operata dalle molecole stesse.

### **3. MATERIALI E METODI**

#### **3.1. Substrati**

I substrati sono stati preparati usando arvicole rossastre di 2-3 mesi di età, omozigoti per l'allele metionina al codone 109 del gene della PrP (BvM109M). Le arvicole sono state sacrificate con CO<sub>2</sub> e immediatamente perfuse utilizzando PBS con 5 mM di EDTA. Tutti i cervelli così depleti del sangue sono stati prelevati e immediatamente omogeneizzati al 10% p/v in Conversion Buffer (PBS pH 7,4; 0,15 M NaCl; 1% Triton X) in presenza di inibitori di proteasi. Il pool così ottenuto è stato diviso in aliquote da 1 ml e conservato in congelatore a -80°C.

#### **3.2. Inoculi**

Tessuti cerebrali di 3 pecore ARQ/ARQ (198/9, ES47/10/2 e ES47/10/3) infette con scrapie italiana, tessuti cerebrali di arvicole rossastre a termine inoculate con 198/9 e sono stati omogenati al 10% p/v in tampone fosfato (PBS) a pH 7,4, in presenza di inibitori di proteasi, suddivisi in aliquote e conservati in congelatore a -20°C, così come i prodotti di PMCA 18K e 14K.

La stessa procedura è stata utilizzata per tessuti cerebrali di arvicole rossastre a termine infette con tre diversi ceppi di Scrapie (Italiana, Inglese e CH16-41-like) e un ceppo di BSE, tutti già adatti *in vivo* all'arvicola.

#### **3.3. Esperimenti di Protein Misfolding Cyclic Amplification**

##### **3.3.1. Replicazione eterologa**

E' stata prodotta una curva di diluizione seriale (p/v), da 10<sup>-2</sup> (1:10) a 10<sup>-8</sup> (1:10000000), degli inoculi di Scrapie 198/9, ES47/10/2 e ES47/10/3 in omogenato cerebrale di arvicola rossastra. 50 µl del primo punto della curva di diluizione sono stati immediatamente congelati a -20°C (Frozen), mentre altri 50 sono stati sottoposti a PMCA. I campioni sono stati posizionati all'interno di un adattatore sistemato sulla piastra di un microsonicatore (Misonix S4000, ultrasonic Liquid Processor) programmato per compiere 96 cicli (equivalenti ad 1 round di PMCA di 48 ore) composti da 30 minuti di incubazione a 37°C e

seguiti da 20 secondi di sonicazione all'80% di potenza. Alla fine di ogni round, 5  $\mu$ l della mix di reazione di PMCA sono stati diluiti 1:10 in substrato di arvicola fresco per un nuovo round di amplificazione in PMCA (serial PMCA).

### **3.3.2. Replicazione omologa**

La stessa curva di diluizione seriale in omogenato cerebrale di arvicola è stata prodotta per il ceppo di Scrapie italiana (SS21) e il ceppo di BSE (v586) entrambi adattati *in vivo* all'arvicola rossastra, conservando immediatamente a -20°C (Frozen) 50  $\mu$ l del primo punto della curva di diluizione. Entrambi i ceppi sono stati propagati serialmente in PMCA attraverso round successivi, usando due paralleli protocolli sperimentali: in un caso in ogni round di PMCA l'inoculo utilizzato è stato sempre diluito 1:10 in substrato di arvicola fresco; alternativamente l'inoculo è stato utilizzato alla diluizione  $10^{-7}$  (p/v) per v586 e  $10^{-5}$  (p/v) per SS21 nei round dispari, e diluito 1:10 nei round pari di PMCA seriale. In entrambi i protocolli sperimentali, il numero totale di round in sPMCA effettuati è stato pari a 9.

### **3.3.3. Replicazione in presenza di composti ad azione anti-prionica**

Le 8 molecole analizzate nello studio sono state aggiunte, alla concentrazione finale di 500, 100, 50, 10, 5 e 1  $\mu$ M, ad omogenato cerebrale di arvicola rossastra, e gli omogenati così adulterati immediatamente utilizzati come substrato per la reazione di PMCA e testati per l'amplificazione degli inoculi di Scrapie Ita-like, UK85 e CH16-41 like alle diluizioni  $10^{-3}$  (p/v). 50  $\mu$ l di ogni punto di diluizione sono stati immediatamente congelati a -20°C, mentre 150 sono stati suddivisi in 3 aliquote da 50  $\mu$ l, così da avere 3 triplicati dello stesso punto di diluizione, poi sottoposti a PMCA. In questo caso il programma di PMCA è stato programmato per compiere 32 cicli, composti come negli esperimenti precedenti da 30 minuti di incubazione a 37°C e seguiti da 20 secondi di sonicazione all'80% di potenza, con una durata complessiva dell'esperimento di 16 ore (esperimento condotto in over night).

### **3.4. Analisi biochimica per la caratterizzazione della PrP<sup>Sc</sup> dopo amplificazione in PMCA**

Con lo scopo di incrementare i controlli sulla possibile circolazione della BSE nei piccoli ruminanti, sono state messe a punto diverse metodiche discriminative di tipo biologico e biochimico. Tra queste è annoverato il metodo discriminatorio dell'ISS (*Istituto Superiore di Sanità discriminatory Western blot; Community Reference Laboratory of the European Union: TSE strain characterization in small ruminants—a technical handbook for national reference laboratories in the EU. 174 Version 4, January 2010.* [http://www.defra.gov.uk/vla/science/docs/sci\\_tse\\_rl\\_handbookv4jan10.pdf](http://www.defra.gov.uk/vla/science/docs/sci_tse_rl_handbookv4jan10.pdf)), saggio molecolare che permette la discriminazione della BSE ovina dalla Scrapie sulla base della differente stabilità conformazionale e solubilità della PrP<sup>Sc</sup> associata alle due EST, nonché sul differente sito della PrP<sup>Sc</sup> riconosciuto e cleavato dalla proteinasi K (PrP<sup>res</sup> typing) e conseguente rapporto anticorpale SAF84/P4. Il saggio di stabilità conformazionale e solubilità utilizza la denaturazione degli aggregati di PrP<sup>Sc</sup> con concentrazioni crescenti di guanidina seguita da una centrifugazione differenziale, e permette la determinazione della concentrazione di guanidina che degrada la metà della PrP<sup>Sc</sup> presente nell'omogenato cerebrale analizzato (GdnHCl<sub>1/2</sub>). Il rapporto anticorpale, invece, è il rapporto del segnale di chemiluminescenza prodotto dal campione in esame quando analizzato separatamente con gli anticorpi anti-PrP SAF84 e P4, relativizzato al rapporto SAF84/P4 della PrP<sup>Sc</sup> della Scrapie ovina. Il rapporto misura il grado di degradazione dell'epitopo N-terminale della PrP<sup>Sc</sup> riconosciuto dall'anticorpo P4, epitopo perso dalla BSE ovina dopo digestione con proteinasi K e mantenuto negli altri casi di Scrapie. Poiché tutte le caratteristiche biochimiche analizzate nel metodo discriminatorio ISS sono ceppo-specifiche, il saggio di Western Blot, debitamente modificato secondo le esigenze, è stato applicato su tutti i campioni analizzati, sia sottoposti ad amplificazione in PMCA sia congelati.

#### **3.4.1. Digestione con PK ed Epitope Mapping**

Ogni campione analizzato è stato incubato per 30 minuti a 37°C ed agitazione costante con un ugual volume di una soluzione Tris-HCl contenente sarcosil al 4% e successivamente sottoposto a digestione con proteinasi K alla concentrazione 100 µg/ml, per un'ora in agitazione a 55°C. Il trattamento proteolitico è stato poi arrestato con l'aggiunta di fenilmetilsulfonil fluorato (PMSF) ad una concentrazione finale di 3 mM. I campioni così

trattati sono stati sottoposti a precipitazione con alcool, aggiungendo un ugual volume di una miscela di isopropanolo/butanolo in un rapporto 1:1 v/v. Dopo centrifuga a 20000g per 10 minuti, il supernatante è stato scartato, mentre il pellet lasciato asciugare, risospeso in Nupage buffer 1X e caricato alla concentrazione di 0,75 mg in gel NuPAGE al 10% in bis-tris poliacrilammide (Invitrogen). L'elettroforesi è stata impostata a 200V per 45 minuti ed il western blotting eseguito su membrana di nitrocellulosa a 30 mA per 60 minuti (Biorad PowerPac 200). Le membrane sono state in seguito analizzate utilizzando lo SNAP i.d. Protein Detection System (Millipore) e la PrP<sup>res</sup> determinata usando gli anticorpi anti-PrP di arvicola SAF84 (a. a. 167-173; 1,2 µg/ml), Sha31 (a. a. 146-152; 0,6 µg/ml), 9A2 (a. a. 99-101; 1 µg/ml), 12B2 (a. a. 93-97; 0,4 µg/ml) e SAF32 (octarepeat; 4,8 µg/ml). Le membrane sono state infine sviluppate con metodo in chemiluminescenza (Super Signal Femto, Pierce) ed il segnale visualizzato mediante un rivelatore di chemiluminescenza digitale (Versadoc Imaging System, Biorad), misurando la quantità di PrP<sup>res</sup> attraverso il software QuantityOne (BioRad).

#### **3.4.2. Conformational Stability Assay**

I campioni da analizzare, sia derivati da omogenato cerebrale che da amplificazione *in vitro*, tutti omogenati in Conversion Buffer, sono stati trattati come descritto in precedenza (Pirisinu *et al.*, 2010). Brevemente, ad aliquote di ogni campione (6% w/v) è stato aggiunto un egual volume di TrisHCl 100 mM (pH 7.4) contenente sarcosyl al 4% e incubate in agitazione per 60 minuti a 37°C. 50 µl di GdnHCl con una concentrazione finale da 0 a 4.0 M sono stati aggiunti ad aliquote di 50 µl di ogni campione in esame. Dopo 1 h di incubazione a 37°C tutti campioni sono stati diluiti fino ad arrivare ad una concentrazione finale di 0.4 M di GdnHCl e sottoposti a digestione con Proteinasi K (50 ug/ml) per un'ora in agitazione a 55°C. La reazione è stata bloccata aggiungendo PMSF alla concentrazione finale di 3 mM, e i campioni così trattati sottoposti a precipitazione con alcool, seguendo la procedura precedentemente spiegata, e analizzati in WB come descritto sopra.

#### **3.4.3. Western Blot discriminatorio modificato**

I campioni provenienti dai 12 rounds di sPMCA sono stati analizzati seguendo uno schema simile a quello del WB discriminatorio utilizzato nella sorveglianza delle EST per la



tipizzazione dei ceppi di Scrapie e BSE in ovi-caprini e bovini (*Istituto Superiore di Sanità discriminatory Western blot; Community Reference Laboratory of the European Union: TSE strain characterization in small ruminants—a technical handbook for national reference laboratories in the EU. 174 Version 4, January 2010.* [http://www.defra.gov.uk/vla/science/docs/sci\\_tse\\_rl\\_handbookv4jan10.pdf](http://www.defra.gov.uk/vla/science/docs/sci_tse_rl_handbookv4jan10.pdf)).

Il rapporto di anticorpi (antibody ratio) è il rapporto del segnale ottenuto in chemiluminescenza, prodotto da un dato campione quando viene calcolato separatamente con gli anticorpi monoclonali SAF84 e P4, relativo al rapporto SAF84/P4 del controllo di Scrapie. Questo rapporto misura il taglio N-terminale della PrP<sup>Sc</sup> a livello dell'epitopo del P4, che avviene nella BSE ovina ma non nella maggior parte dei casi di Scrapie. In questo caso sono stati utilizzati come anticorpi discriminativi gli anticorpi anti-PrP 12B2 e SAF32, rispettivamente per le analisi dei campioni v586 e SS21, e variazioni nel rapporto di anticorpi sono stati utilizzati come strumento per identificare variazioni conformazionali della PrP<sup>Sc</sup>, e quindi l'emergenza di mutanti conformazionali.

#### **3.4.4. Calcolo del Fattore di Amplificazione**

Per gli esperimenti effettuati per valutare l'effetto inibitorio delle piccole molecole anti-prioniche, in ogni gel è stata caricata una curva di diluizione, o curva standard, equivalente a 0.1, 0.03, 0.01 e 0.003 mg per lane di tessuto cerebrale di arvicola infetto con Scrapie. Come per la discriminazione dei mutanti, utilizzando il software QuantityOne è stato possibile ricavare l'intensità del segnale di chemiluminescenza di ogni punto di diluizione, costruendo quindi una curva standard che permette di comparare per estrapolazione segnale chemiluminescente e quantità di PrP<sup>res</sup> (in mg equivalenti) dei campioni di PMCA. Il fattore di amplificazione per ogni reazione è stato ricavato dividendo la quantità di mg equivalenti di PrP<sup>res</sup> calcolata nell'ultimo campione quantificabile (la cui intensità di segnale è cioè ancora compresa nell'intervallo di intensità di segnale generato dalla curva standard) sottoposto ad un round di PMCA, in presenza o assenza di molecole inibitorie, per la quantità di PrP<sup>res</sup> contenuta nella diluizione 10<sup>-2</sup> non sottoposta a PMCA, moltiplicato per il fattore di diluizione tra i due campioni in esame. Fattori di amplificazione pari o minori a 1 indicano un effetto inibitorio totale sulla replicazione *in vitro* della PrP<sup>Sc</sup>.

### **3.5. Caratterizzazione biologia della PrP<sup>Sc</sup> amplificata in PMCA e dell'isolato naturale di scrapie**

#### **3.5.1. Esperimenti di trasmissione**

Gruppi di arvicole rossastre di circa otto settimane di età sono state inoculate intracerebralmente (previa anestesia con ketamina 0.1 µg/g) nell'emisfero cerebrale sinistro, con 20 µl di omogenato cerebrale al 10% di pecora affetta da Scrapie (isolato 198/9) o con 20 µl del prodotto di reazione post-PMCA, diluito 1:10. Gli animali sono stati esaminati due volte la settimana fino all'insorgenza dei sintomi, e poi controllati giornalmente; gli animali allo stadio terminale della malattia sono stati sacrificati con CO<sub>2</sub>. Il tempo di sopravvivenza è stato calcolato come l'intervallo di tempo tra l'inoculazione e la morte dell'animale. I cervelli degli animali sacrificati sono stati quindi prelevati e divisi a metà lungo il piano parasagittale; una metà è stata congelata a -80°C e successivamente omogenata per analisi molecolari della PrP<sup>Sc</sup>, l'altra è stata invece fissata in formalina per le analisi di patologia. Gli inoculi per il secondo passaggio sono stati preparati, come omogenati cerebrali al 10% p/v in PBS, utilizzando il cervello del primo animale sintomatologico di ogni gruppo di arvicole inoculate nel primo passaggio.

#### **3.5.2. Analisi istopatologica**

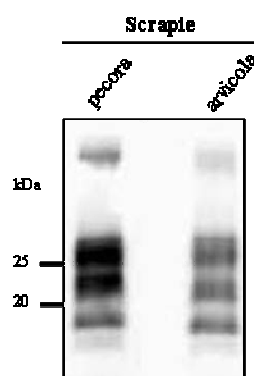
L'analisi di istopatologia è stata condotta su tessuti cerebrali fissati in formalina, come descritto da Nonno e colleghi (*Nonno et al., 2006*). I cervelli sono stati tagliati, immersi in cera di paraffina e tagliati a 6 µm di spessore per la colorazione in ematossilina e eosina, immunohistochimica e PET-blot. Sezioni analizzate con la colorazione ematossilina e eosina sono state utilizzate per la costruzione dei profili delle lesioni, quantificando il grado di vacuolizzazione in nove differenti aree cerebrali di sostanza grigia di almeno sei arvicole per gruppo di inoculo. L'anticorpo anti-PrP SAF84 è stato utilizzato per l'analisi immunohistochimica e il PET-blot.

## 4. RISULTATI

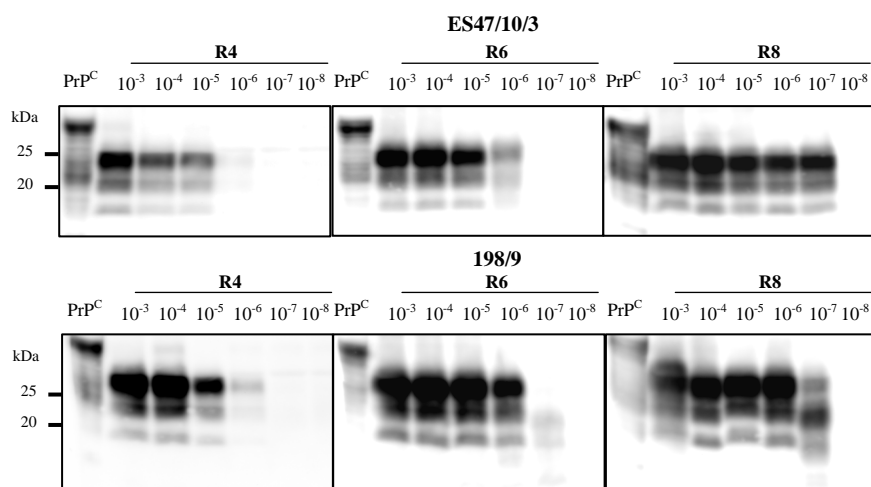
### 4.1. Isolamento e caratterizzazione di un mutante conformazionale derivato dalla Scrapie ovina

E' stato recentemente dimostrato come l'arvicola rossastra sia un modello animale sensibile a numerose EST, Scrapie inclusa, (Di Bari *et al.*, 2008) e come l'omogenato cerebrale di arvicola permetta una efficiente amplificazione dei prioni in PMCA (Cosseddu *et al.*, 2011). In questo contesto, il primo approccio che abbiamo intrapreso per investigare la mutabilità dei prioni *in vitro* è stata quella della replicazione eterologa, ovvero che vede l'interazione tra PrP<sup>Sc</sup> e PrP<sup>C</sup> appartenenti a specie differenti. Tale contesto mima infatti la trasmissione interspecifica, condizione nella quale è più frequente osservare *in vivo* eventi di mutazione dei prioni.

La PrP<sup>Sc</sup> isolata sia da ovini che da arvicole rossastre affetti da Scrapie è caratterizzata da un frammento resistente alle proteasi (PrP<sup>res</sup>) C-terminale, dal peso molecolare di 18 kDa (frammento non glicosilato) (Fig. 2). E' stata quindi condotta un'analisi della sensibilità di detection della Scrapie ovina in bvPMCA, cioè PMCA che utilizza PrP<sup>C</sup> di arvicola come substrato, sottoponendo diluizioni seriali di 3 diversi isolati naturali di Scrapie ovina (198/9, ES47/10/2 e ES47/10/3) a round seriali di bvPMCA. Dai risultati è emerso come il bvPMCA sia capace di amplificare isolati naturali di Scrapie ovina, con un limite di detection di  $10^{-6}/10^{-7}$  dopo 8 rounds consecutivi di replicazione (Fig. 3). In letteratura è riportato come la PrP<sup>Sc</sup> replicata *in vitro* mostri le stesse caratteristiche dell'inoculo di partenza, molecolari e biologiche. Anche in questo esperimento, con la sola eccezione dell'isolato 198/9, la PrP<sup>Sc</sup> amplificata *in vitro* mostrava lo stesso, e atteso, profilo elettroforetico dopo digestione con proteinasi K (PrP<sup>res</sup>) della PrP<sup>Sc</sup> dell'inoculo di Scrapie; sulla base del peso molecolare del frammento di PrP<sup>res</sup> non glicosilato, ci si è riferiti a questa PrP<sup>Sc</sup> come 18K (Fig. 3). L'isolato 198/9, invece, mostrava amplificati due differenti tipi di PrP<sup>Sc</sup>, uno identico all'inoculo di partenza (18K), e l'altro caratterizzato da una differente PrP<sup>res</sup>. Il nuovo tipo di PrP<sup>Sc</sup>, caratterizzato da un frammento di PrP<sup>res</sup> non glicosilato di circa 14 kDa e per questo denominato 14K, emergeva esclusivamente alle alte diluizioni dell'inoculo, e in particolare dall'ultima diluizione amplificabile ( $10^{-7}$ ) dopo il sesto round di bvPMCA (Fig. 3). Sulla base di queste caratteristiche la PrP<sup>Sc</sup> 14K è stata considerata "mutante". Il nuovo tipo di PrP<sup>Sc</sup> emerso è stato quindi clonato, cioè sottoposto a 5 ulteriori rounds di PMCA e poi diluito serialmente e amplificato per altri 3 rounds *in vitro*. I punti della curva di diluizione  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  sono quindi stati uniti, diluiti 1:100 in



**Figura 2. Western Blot di un ceppo di Scrapie in pecora e in arvicola.** La PrP<sup>Sc</sup> isolata da un cervello di pecora affetta da Scrapie classica e da arvicola inoculata con lo stesso isolato di Scrapie ovina è stata digerita con proteinasi K, analizzata in Western Blot, e la PrP<sup>res</sup> visualizzata con l'anticorpo anti-PrP 12B2 (a. a. 93-97). I due campioni mostrano lo stesso profilo elettroforetico, caratterizzato da un frammento di PrP<sup>res</sup> non glicosilato del peso molecolare di circa 18 kDa.



**Figura 3. Identificazione del conformero 14K da un isolato naturale di Scrapie classica durante amplificazione *in vitro* su substrato di arvicola rossastra.** Diluizioni seriali di due isolati di Scrapie italiana, ES47/10/3 e 198/9, sono state sottoposte a rounds consecutivi di PMCA su substrato di arvicola. I prodotti delle reazioni del quarto, sesto e ottavo round (R4, R6 e R8) sono stati analizzati in Western Blot e la PrP<sup>res</sup> visualizzata con l'anticorpo anti-PrP SAF84 (a. a. 167-173). Da entrambi i campioni è stata amplificata PrP<sup>Sc</sup> caratterizzata da un profilo elettroforetico dopo digestione con PK simile a quello della Scrapie (18K), con una sensibilità di detection di  $10^{-7}$  dopo 8 rounds. Il campione 198/9 mostrava però l'amplificazione di un secondo tipo di PrP<sup>Sc</sup> (14K), esclusivamente dall'ultima diluizione detectabile del campione 198/9, dopo il sesto round di amplificazione *in vitro* (parte bassa del pannello).

omogenato cerebrale di arvicola, splittati in 28 tubi e infine sottoposti a due rounds di PMCA, in modo da produrre una grande quantità del conformero di PrP<sup>Sc</sup> 14K. Quindi, dopo un totale di 21 rounds di PMCA e un fattore di diluizione complessivo di 10<sup>-31</sup>, è stato ottenuto un campione di 14K “clonato”; il campione così ottenuto insieme alla PrP<sup>Sc</sup> 18K (wild-type) è stato oggetto della prima parte del lavoro di tesi.

#### **4.1.1. Tasso di amplificazione *in vitro***

Studi *in vivo* e *in vitro* hanno mostrato come l'abilità di influenzare il tasso di formazione di nuove molecole di PrP<sup>Sc</sup> da PrP cellulare sia ceppo- e quindi conformazione-specifica (Mulcahy & Bessen 2004; Gonzalez-Montalban & Baskakov 2012). E' stata quindi valutata l'efficienza di replicazione *in vitro* dei due differenti tipi di PrP<sup>Sc</sup>, per determinare se al differente profilo elettroforetico identificato corrispondesse anche una differente abilità di transconformazione della PrP<sup>C</sup>. E' stata quindi prodotta una curva di diluizione seriale (da 10<sup>-2</sup> a 10<sup>-6</sup>) in omogenato cerebrale di arvicola dei due campioni 18K e 14K. Per entrambi i campioni in analisi il primo punto di diluizione (10<sup>-2</sup>) è stato preparato in doppio e immediatamente congelato o sottoposto insieme agli altri punti ad un round di PMCA, così da poter determinare la diluizione maggiore cui era ancora possibile osservare replicazione della PrP<sup>Sc</sup> fino a livelli detectabili in Western Blotting. Per il campione 18K è stato possibile rilevare PrP<sup>res</sup> nei campioni sottoposti a PMCA fin nell'ultima diluizione, 10<sup>-6</sup>, indicando un'efficiente amplificazione della PrP<sup>Sc</sup>. Invece, la stessa analisi condotta sul campione 14K ha mostrato un'efficienza di amplificazione della PrP<sup>Sc</sup> “mutante” circa cento volte minore (Fig. 4A).

I risultati fin qui esposti suggeriscono quindi che 18K e 14K, entrambi derivati da un unico isolato di Scrapie ovina, posseggano caratteristiche biochimiche (tipo di PrP<sup>Sc</sup>) e biologiche (efficienza di replicazione *in vitro*) differenti. Si è proceduto quindi ad una analisi formale e più dettagliata delle caratteristiche biochimiche e biologiche di 18K e 14K.

#### 4.1.2. Caratterizzazione biochimica della PrP<sup>Sc</sup> di 18K e 14K

In accordo con quanto descritto in materiali e metodi, la caratterizzazione delle proprietà biochimiche della PrP<sup>Sc</sup> è stata eseguita mediante approcci sperimentali sviluppati in passato per la discriminazione molecolare dei ceppi di EST animali, con particolare riferimento alla discriminazione tra Scrapie e BSE nei piccoli ruminanti (*Pirisinu et al., 2010 e 2011, Migliore et al., 2012*). Tali metodi, in parte modificati come descritto sotto, sono stati applicati sia sui campioni originali (isolati ovis), sia sui campioni prodotti *in vitro* che, infine, sulla PrP<sup>Sc</sup> isolata da cervelli di arvicole inoculate con isolati naturali o con prodotti di amplificazione *in vitro*.

##### 4.1.2.1. Epitope mapping della PrP<sup>res</sup>

Le analisi iniziali condotte su 18K e 14K mostrano come entrambe le PrP<sup>res</sup> conservino i siti di glicosilazione, come si evince dalla presenza nei WB delle tre glicoforme di PrP<sup>res</sup> (Fig. 4A e 4B), suggerendo che entrambi i tipi di PrP<sup>res</sup> includano la porzione C terminale della proteina, comprendente entrambi i siti di N glicosilazione. Il differente profilo elettroforetico mostrato dalle due PrP<sup>res</sup> indicava che 18K e 14K avessero un differente sito di taglio della proteinasi K, e quindi, verosimilmente, due differenti conformazioni. Per confermare ed estendere queste osservazioni iniziali, anticorpi monoclonali diretti verso differenti epitopi della PrP (epitope mapping) sono stati utilizzati per determinare i siti di taglio della proteinasi K lungo la PrP<sup>Sc</sup> 14K e 18K. La PrP<sup>Sc</sup> 18K è stata riconosciuta dall'intero set di anticorpi utilizzati (SAF84, Sha31, 12B2 and SAF32), il che indica che questo tipo di PrP<sup>Sc</sup> è caratterizzato dalla presenza del classico frammento di PrP<sup>res</sup> ~80-232, simile a quello precedentemente osservato in pecore e arvicole inoculate con Scrapie classica (*Pirisinu et al., 2010; Pirisinu et al., 2013*) (Fig. 4B).

Al contrario, tutti gli epitopi N terminali analizzati erano assenti nella PrP<sup>res</sup> di 14K, che veniva riconosciuta esclusivamente dall'anticorpo C terminale SAF84 (Fig. 4B). L'incapacità dell'anticorpo Sha31, che lega la porzione aminoacidica della proteina 163-169, di riconoscere l'epitopo a concentrazioni stringenti di proteinasi K (200 µg/ml) ma non a concentrazioni di PK minori indica che la PrP<sup>Sc</sup> 14K ha un sito di taglio alla PK intorno al sito 152-163. Ciò vuol dire che 14K è caratterizzato da un atipico frammento di PrP<sup>res</sup> ~155-232, più C terminale del frammento C1 (~111-232) derivante dal processamento fisiologico proteolitico della PrP<sup>C</sup> *in vivo* (*Chen et al., 1995*).

#### 4.1.2.2. Conformational Stability Assay

È stato mostrato come la resistenza/suscettibilità della PrP<sup>Sc</sup> agli agenti denaturanti sia un'altra proprietà biochimica ceppo-specifica. La capacità della PrP<sup>Sc</sup> di mantenere la propria conformazione dopo trattamenti denaturanti (stabilità conformazionale) viene misurata utilizzando la resistenza alla digestione con proteinasi K come marker di proteine non denurate. Sfruttando la capacità discriminatoria del Conformational Stability Assay (Peretz *et al.*, 2001), è stata calcolata la stabilità conformazionale dei due differenti tipi di PrP<sup>Sc</sup> in seguito a trattamento con concentrazioni crescenti di GdnHCl (Cloruro di Guanidina). Come atteso, entrambi i campioni mostrano un pattern di transizione sigmoideale in funzione di concentrazioni crescenti di Cloruro di Guanidina, ma con valori di stabilità conformazionale differenti (Fig. 4C). Infatti, mentre 14K è caratterizzato da una elevata stabilità conformazionale, con valori di [GdnHCl]<sub>1/2</sub> pari a 2.0 M, 18K mostra valori decisamente minori ([GdnHCl]<sub>1/2</sub> pari a 1.3 M) (Fig. 4D).

Complessivamente, l'analisi biochimica ha confermato come 18K e 14K siano effettivamente due diversi aggregati di PrP<sup>Sc</sup>, capaci di transconformare la PrP<sup>C</sup> *in vitro*, e caratterizzati da una differente conformazione.

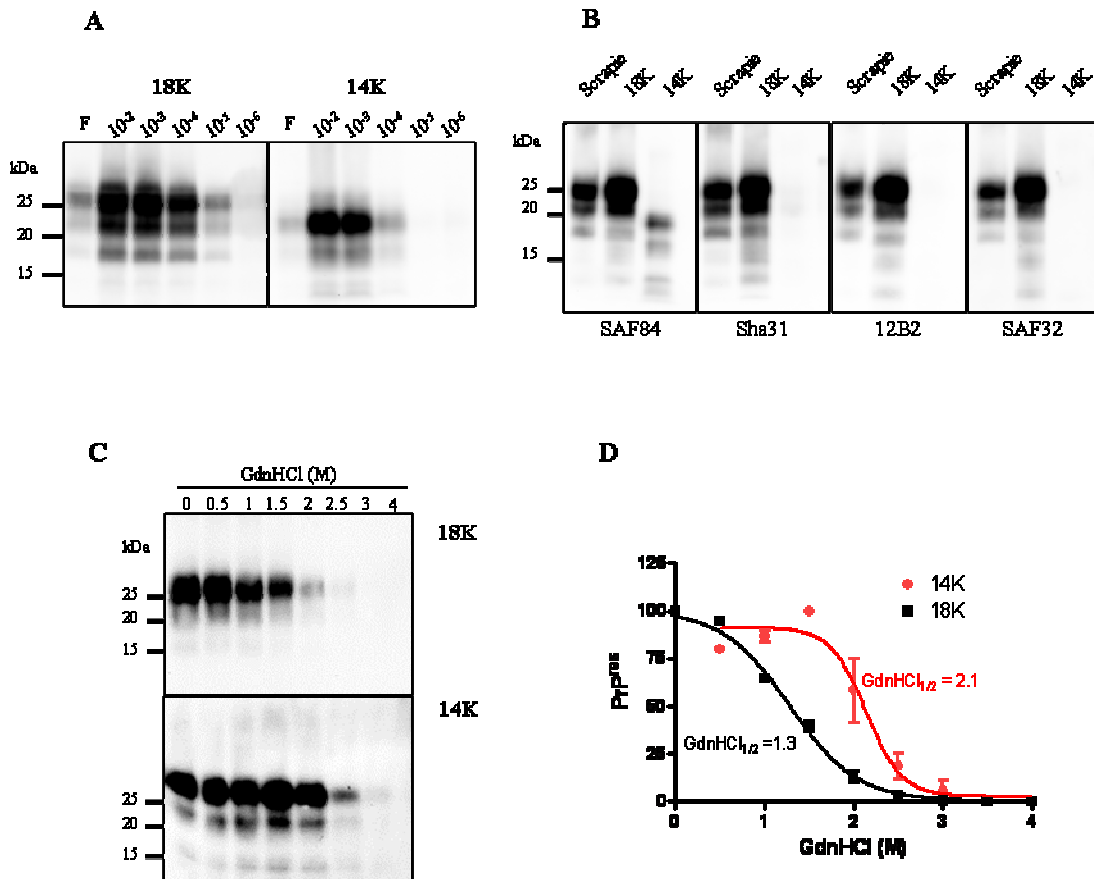
#### 4.1.3. Caratterizzazione biologica della PrP<sup>Sc</sup> di 18K e 14K

Il metodo di riferimento per identificare e discriminare i ceppi di prioni rimane la tipizzazione biologica tramite infezione sperimentale di roditori da laboratorio e analisi dei fenotipi di malattia. Al fine di determinare se la replicazione *in vitro* di isolati naturali preserva le caratteristiche di ceppo originarie, e se i 2 conformeri originati *in vitro*, 18K e 14K, rappresentino effettivamente ceppi distinti, sia i prodotti *in vitro* (18K e 14K) sia l'isolato naturale di Scrapie classica 198/9 da cui sono originati, sono stati quindi inoculati ed adattati in arvicola rossastra.

##### 4.1.3.1. Trasmissione in arvicole dell'isolato naturale ovino di Scrapie classica

Il ceppo di Scrapie classica usato come inoculo iniziale degli esperimenti di PMCA ha mostrato un tasso di mortalità del 100%, con un tempo di sopravvivenza medio di 167 giorni dopo inoculazione intracerebrale in arvicola rossastra (Tab.1). La trasmissione

secondaria, come atteso, è stata caratterizzata da una diminuzione del tempo di sopravvivenza fino a 94 giorni, a prova della barriera di trasmissione esistente tra pecora e arvicola (Tab. 1).



**Figura 4. Tipizzazione molecolare dei due conformeri di PrP<sup>Sc</sup> 18K e 14K. A) Tasso di amplificazione.** Una curva di diluizione dei due conformeri 18K e 14K è stata sottoposta ad un round di PMCA su substrato di arvicola rossastra. I prodotti di ogni reazione sono stati digeriti con PK, analizzati in Western Blot e la PrP<sup>res</sup> visualizzata con l'anticorpo anti-PrP SAF84. Per ogni curva è stato aggiunto il Frozen (F), cioè la diluizione 10<sup>-2</sup> dell'inoculo non sottoposta ad amplificazione *in vitro*. **B) Epitope mapping.** I conformeri 18K e 14K, insieme ad un ceppo di Scrapie adattata all'arvicola, sono stati digeriti con PK alla concentrazione di 200 µg/ml, e analizzati in Western Blot. Le membrane sono state trattate con diversi anticorpi anti-PrP, indicati sotto ogni blot in figura. **C, D) Conformational Stability Assay.** 18K e 14K sono stati sottoposti ad incubazione con differenti concentrazioni di Cloruro di Guanidina e successivamente digeriti con PK e analizzati in Western Blot. La PrP<sup>res</sup> è stata quindi visualizzata con l'anticorpo anti-PrP SAF84. Sulla base dei segnali di PrP<sup>res</sup> ottenuti è stato prodotto un grafico (D) rappresentante la curva di denaturazione dei due campioni 18K e 14K, che mostrano valori di [GdnHCl]<sub>1/2</sub> rispettivamente pari a 1.3 M e 2.1 M.



Il profilo delle lesioni, che misura il grado di coinvolgimento delle diverse aree cerebrali attraverso una valutazione semi-quantitativa delle lesioni spongiotiche in specifiche aree cerebrali, è una classica metodologia utilizzata per discriminare i ceppi di EST in roditori (Di Bari *et al.*, 2012). Il profilo delle lesioni in arvicole dopo trasmissione secondaria di 198/9 è risultato identico a quello osservato dopo tipizzazione biologica di altri isolati italiani di Scrapie ovina (Di Bari *et al.*, 2008). Parimenti, la PrP<sup>res</sup> identificata nei cervelli degli animali malati ha mostrato esclusivamente il profilo elettroforetico atteso, con un peso molecolare di 18K (Fig. 5A e 5B), identico a quella dell'inoculo ovino (Fig. 2). A conferma che durante trasmissioni seriali i prioni mantengono inalterate le proprie caratteristiche ceppo-specifiche, l'isolato 198/9 trasmesso in arvicola ha preservato non solo il profilo elettroforetico ma anche la stabilità conformazionale della PrP<sup>Sc</sup>, con valori di  $[GdnHCl]_{1/2}$  pari a 2.1 M (Fig. 5C), già osservati in precedenza in casi di Scrapie italiana (Pirisinu *et al.*, 2010; Pirisinu *et al.*, 2011).

#### **4.1.3.2. Trasmissione in arvicole del prodotto di 18K derivato da replicazione in PMCA**

Il conformero 18K replicato *in vitro* su PrP<sup>C</sup> di arvicola si è rivelato ancor più efficiente dell'isolato di Scrapie originale, mostrando un tasso di mortalità del 100% ed un tempo di sopravvivenza di 117 giorni già dopo trasmissione primaria, contro i 167 dell'isolato naturale. Questo conferma precedenti osservazioni in altri modelli sperimentali ed è il risultato dell'adattamento *in vitro* della Scrapie ovina alla sequenza di PrP<sup>C</sup> di arvicola rossastra. In accordo con questa interpretazione, la trasmissione secondaria non ha mostrato barriera di trasmissione, poiché il tempo di sopravvivenza ha mostrato solo una leggera diminuzione rispetto alla trasmissione primaria, convergendo così al fenotipo osservato per l'isolato di Scrapie ovina originario 198/9 (Tab. 1). Inoltre, 18K ha indotto lo stesso fenotipo neuropatologico dell'isolato 198/9, come mostrato dal profilo delle lesioni, nonché lo stesso fenotipo molecolare (Fig. 5A e 5B). La PrP<sup>Sc</sup> isolata da cervelli di arvicole inoculate con il conformero 18K o con l'isolato 198/9 ha mostrato infatti lo stesso profilo elettroforetico dopo digestione con PK (Fig. 5B) e la stessa stabilità conformazionale (Fig. 5C), con valori di  $[GdnHCl]_{1/2}$  rispettivamente pari a 2.1 e 2 M (Fig. 5C). Questi dati confermano che le caratteristiche dei ceppi di Scrapie sono preservate dopo adattamento in arvicola (Pirisinu *et al.*, 2010) e dimostrano inoltre che la replicazione *in vitro* eterologa non altera le caratteristiche del ceppo: quale che sia l'adattamento, *in vivo* o *in vitro*, alla

PrP<sup>C</sup> del nuovo ospite, il ceppo risultante è il medesimo.

	Trasmissione Primaria		Trasmissione Secondaria	
	Tempo di sopravvivenza	Tasso di mortalità	Tempo di sopravvivenza	Tasso di mortalità
<b>198/9</b>	167 ± 13	9/9	94 ± 3	8/8
<b>18K</b>	117 ± 9	9/9	92 ± 4	8/8
<b>14K</b>	>697	0/9		

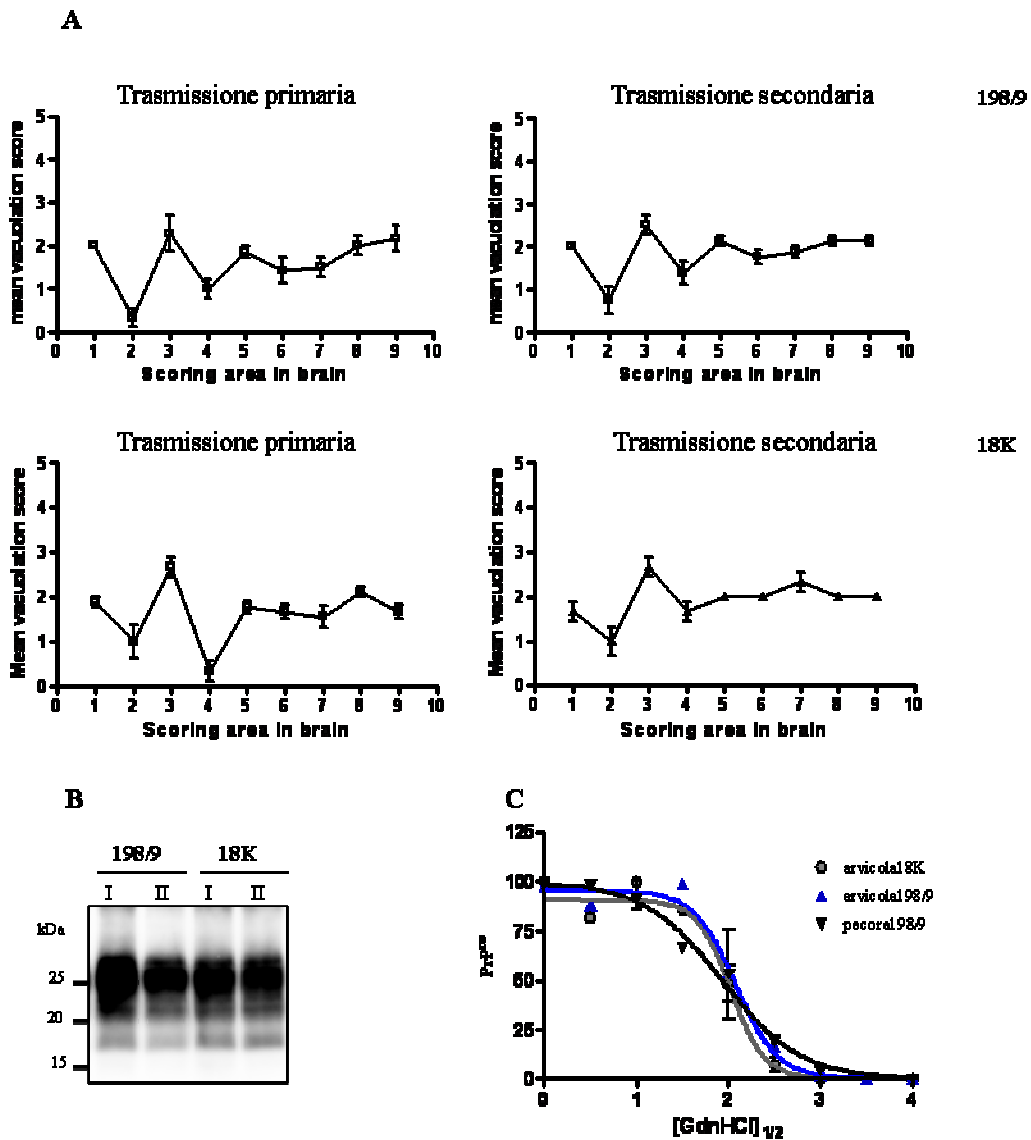
**Tabella 1. Tipizzazione biologica dei conformeri di PrP<sup>Sc</sup> 18K e 14K. Tempo di sopravvivenza e tasso di mortalità durante trasmissione in arvicola rossastra.** 3 gruppi di arvicola rossastra sono stati inoculati con i due conformeri originati *in vitro* 18K e 14K e con l'inoculo di pecora originale (198/9). Per ogni trasmissione sono riportati tempo di sopravvivenza, in giorni (media ± deviazione standard), e tasso di mortalità, cioè numero di animali sintomatici sul totale degli animali inoculati. L'isolato originale di Scrapie 198/9 e il conformero di PrP<sup>Sc</sup> 18K mostravano identico tempo di sopravvivenza in trasmissione secondaria, e un tasso di mortalità del 100% in entrambe le trasmissioni primaria e secondaria. Arvicole inoculate con 14K non mostravano alcun fenotipo clinico fino oltre i 697 giorni dopo l'inoculo.

#### **4.1.3.3. Trasmissione in arvicole del prodotto di 14K derivato da replicazione in PMCA**

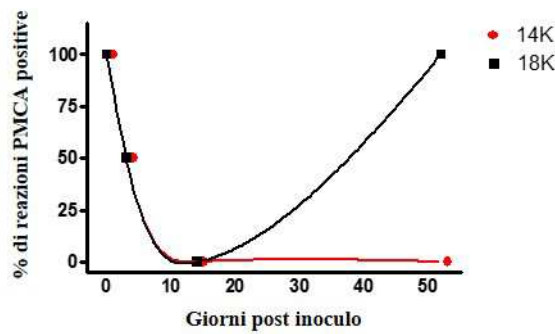
Il conformero 14K, invece, è risultato incapace di causare malattia (Tab. 1). Nessuno degli animali inoculati ha infatti mostrato segni clinici fino a oltre 697 giorni post inoculo e tutte le arvicole trovate morte o sacrificate per altre malattie intercorrenti sono risultate negative per neuropatologia e Western Blotting. L'incapacità del conformero 14K di trasmettersi in arvicola e quindi di replicare su PrP<sup>C</sup> di arvicola *in vivo* è chiaramente in contrasto con la sua efficiente replicazione su PrP<sup>C</sup> di arvicola *in vitro*. E stata quindi condotta una analisi cinetica *in vivo* della presenza dei conformeri 14K e 18K in seguito ad inoculazione intracerebrale in arvicole, in modo da valutare le cinetiche di replicazione e clearance di

14K per determinare la causa di questa inefficiente trasmissione. A tal fine, due gruppi composti ognuno da 8 arvicole sono stati inoculati con il conformero 14K o 18K e poi sacrificati a tempi differenti (0, 3, 14 e 52 giorni post inoculo); i cervelli delle arvicole sacrificate sono stati quindi analizzati in PMCA (3 rounds consecutivi) su PrP<sup>C</sup> di arvicola, e la PrP<sup>Sc</sup> isolata nei cervelli analizzata in Western blotting. La PrP<sup>res</sup> di 18K e 14K è stata facilmente rilevabile al tempo 0 (ovvero subito dopo l'inoculo), ma si assisteva ad una notevole diminuzione dell'intensità del segnale dopo 3 giorni, fino ad arrivare ad assenza di segnale 14 giorni dopo l'inoculazione, mostrando così come la clearance dell'ospite agisca allo stesso modo sui due conformeri di PrP<sup>Sc</sup>. Invece, mentre la PrP<sup>res</sup> di 18K era nuovamente rilevabile 52 giorni dopo l'inoculo, a indicare una attiva ed efficiente replicazione del conformero nel cervello di arvicola, nessun segnale si riscontrava dopo 52 giorni nei cervelli di arvicola inoculati con 14K (Fig. 6). Al fine di escludere che 14K avesse comunque replicato *in vivo*, pur con efficienza così bassa da non causare malattia, con la stessa metodologia di PMCA sono stati analizzati i cervelli di arvicole inoculate con 14K a tempi post-inoculo molti più lunghi, ma nessun segnale di PrP<sup>res</sup> è stato identificato. Infine, onde escludere una replicazione nei tessuti linforeticolari e non nel cervello (Beringue *et al.*, 2012) sono state anche testate le milze dei soggetti più vecchi, non ottenendo neanche in questo caso identificato evidenza della presenza di 14K.

In conclusione, il conformero 14K risulta quindi incapace di trasmettere la malattia *in vivo*, perché incapace di replicare *in vivo* ad un tasso superiore a quello della clearance dell'ospite. A tal proposito, è utile ricordare che i fenomeni di clearance sono verosimilmente assenti *in vitro*, a parziale spiegazione della capacità di 14K di replicare *in vitro*, pur con bassa efficienza, ma non *in vivo*.



**Figura 5.** Profilo delle lesioni (A) e tipizzazione della PrP<sup>res</sup> (B) in trasmissioni primarie e secondarie in arvicola del campione prodotto in PMCA 18K e dell'isolato di Scrapie originale 198/9. L'isolato di Scrapie 198/9 trasmesso in arvicola mostrava fenotipo patologico e PrP<sup>res</sup> identici a quelli che caratterizzano isolati di Scrapie ovina. Identiche caratteristiche sono state riscontrate in 18K. La PrP<sup>Sc</sup> isolata in arvicole inoculate con 18K e 198/9 mostrava quindi le stesse caratteristiche biochimiche dell'inoculo di pecora (B e C), indicando che lo stesso ceppo è stato isolato amplificando 198/9 *in vivo* e *in vitro*. Infatti, il grafico della curva di denaturazione dei tre tipi di PrP<sup>Sc</sup> mostrava stabilità conformazionali convergenti, con valori di [GdnHCl]<sub>1/2</sub> pari a 1.9 M per la PrP<sup>Sc</sup> ovina (pecora198/9), 2.3 M per la PrP<sup>Sc</sup> ovina adattata *in vivo* all'arvicola (arvicola198/9) e 2 M per la PrP<sup>Sc</sup> ovina adattata *in vitro* all'arvicola (arvicola18K).



**Figura 6. Analisi cinetica *in vivo* dei conformeri di PrP<sup>Sc</sup> 18K e 14K.** Grafico che indica la cinetica di replicazione *in vivo* dei conformeri 18K e 14K. I valori sull'asse delle Y rappresentano la percentuale di campioni positivi dopo tre rounds di PMCA, mentre sull'asse delle X sono riportati i giorni post inoculo.

Come detto, per definizione ceppi differenti mostrano differente fenotipo biochimico e clinico-patologico dopo trasmissione in modelli animali. Nonostante i conformeri 18K e 14K abbiano mostrato differenti caratteristiche molecolari e differenti proprietà biologiche, non è possibile parlare di ceppi di prioni diversi, poiché caratteristica *sine qua non* per definire un prione è la capacità di trasmettersi *in vivo*. In questo senso, l'identificazione *in vitro* di una variante conformazionale di PrP<sup>Sc</sup>, auto-catalitica *in vitro* ma incapace di replicare *in vivo*, che emerge esclusivamente ad alte diluizioni dell'isolato di partenza, porta a ipotizzare che 14K sia un mutante difettivo derivato da 198/9. L'emergenza di mutanti difettivi da isolati virali replicati per vari passaggi a bassa bassa molteplicità di infezione è infatti un fenomeno ben noto, nonché tipico delle popolazioni virali altamente mutanti (quasi-specie) (Domingo *et al.*, 2012; Ojosnegros *et al.*, 2011). L'identificazione di 14K rafforzerebbe quindi l'ipotesi che i ceppi di prioni siano soggetti a eventi di mutazione e selezione e si comportino come una quasi-specie.

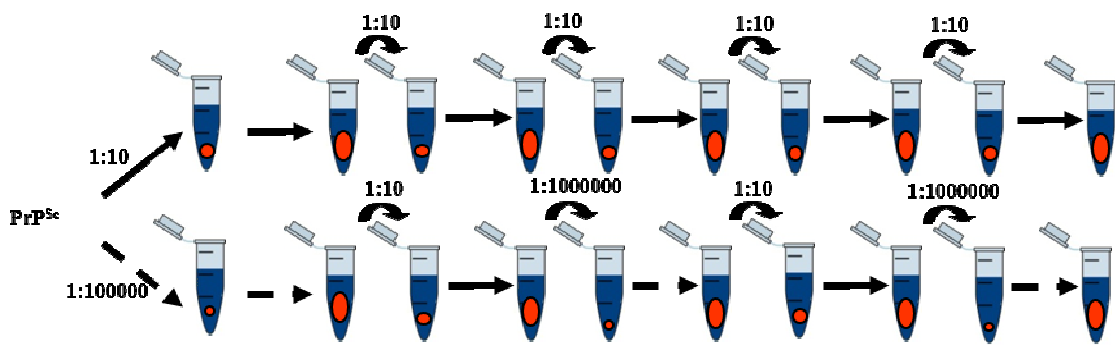
Sulla base di questi risultati, scopo della seconda parte del programma di dottorato è stato investigare in PMCA l'intrinseca mutabilità dei prioni, propria di una popolazione con struttura a quasi-specie, in condizioni di replicazione omologa e in assenza di forti limiti di selezione.

## 4.2. Mutabilità come proprietà intrinseca dei prioni: identificazione di mutanti conformazionali in assenza di agenti di selezione

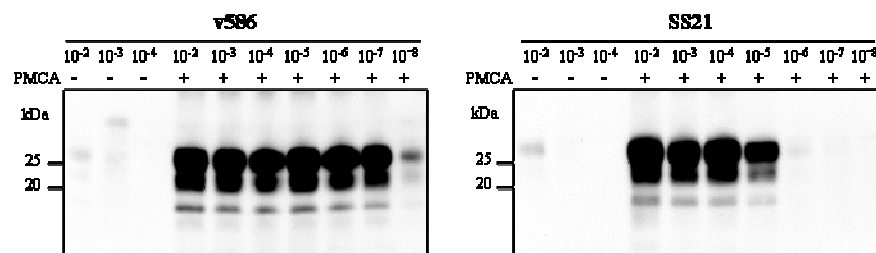
Per verificare la struttura a quasispecie dei ceppi di prioni, è stato indagato il potenziale evolutivo di un ceppo di Scrapie italiana ed uno di BSE, entrambi adattati *in vivo* all'arvicola rossastra, sottoponendo i due ceppi a differenti regimi di popolazione. Entrambi i ceppi sono stati sottoposti a due diversi regimi di replicazione *in vitro* lungo più cicli di replicazione in PMCA. Poiché dopo ogni round di PMCA una quota del prodotto finale (tipicamente l'1-10% del totale) viene utilizzata come seed per avviare il round successivo, al fine di mimare cicli di replicazione ad alta o bassa molteplicità di infezione abbiamo definito due diversi protocolli di replicazione : i) effettuando i passaggi tra i rounds di PMCA trasferendo l'1% della popolazione prodotta nel round precedente, ii) effettuando i passaggi tra i rounds di PMCA trasferendo la minima quantità efficace della popolazione prodotta nel round precedente, il che mima ripetuti eventi "a collo di bottiglia" nella storia evolutiva di queste popolazioni (Fig. 7). Al fine di identificare l'eventuale emergenza di mutanti conformazionali sono state utilizzate le tecniche di caratterizzazione biochimica della PrP<sup>Sc</sup> sopra descritte.

### 4.2.1 Set up sperimentale

Allo scopo di determinare la migliore diluizione dell'inoculo da utilizzare per mimare un evento a collo di bottiglia per i due ceppi in analisi, per entrambi è stata prodotta una curva di diluizione in omogenato cerebrale di arvicola e le curve risultanti sono state sottoposte ad un singolo round di PMCA. I prodotti di reazione sono stati quindi digeriti con proteinasi K e la PrP<sup>res</sup> visualizzata in Western Blot. Il ceppo di BSE adattato all'arvicola, v587, ha mostrato una efficiente replicazione *in vitro*; è stato infatti possibile evidenziare un livello di amplificazione fin nella diluizione  $10^{-7}$  (Fig. 8). Per il ceppo di Scrapie adattato all'arvicola, identificato dalla sigla SS21, è stato invece possibile detectare PrP<sup>res</sup> amplificata fino alla diluizione  $10^{-5}$  (Fig. 8). Questi parametri hanno permesso di definire le condizioni limitanti di replicazione da impartire nei protocolli esposti più sopra. Esperimenti preliminari di repliche successive di v586 seminate alla diluizione di  $10^{-7}$  hanno però determinato la progressiva estinzione della popolazione, nonostante lo stesso ceppo desse elevati livelli di PrP<sup>Sc</sup> dopo un singolo ciclo.



**Figura 7. Amplificazione *in vitro* della PrP<sup>Sc</sup> sottoposta a differenti regimi replicativi.** Omogenato cerebrale al 10% di arvicole infette (in rosso) è stato diluito in omogenato cerebrale sano al 10% di arvicola (in blu). In repliche effettuate attraverso ampi passaggi di popolazione (parte alta della figura), l'inoculo è stato diluito 1:10 (v/v), sottoposto ad un round di PMCA e il prodotto di reazione diluito nuovamente 1:10 (v/v) in substrato fresco. Questa procedura è stata ripetuta per tutti i rounds successivi al primo. In repliche che mimano invece eventi a collo di bottiglia (parte bassa della figura), l'inoculo è stato diluito 1:1000000 nei rounds dispari e diluito 1:10 (v/v) nei rounds pari. Mentre il ceppo v587 è stato diluito 1:1000000 nei round dispari, il ceppo SS21 è stato utilizzato diluito 1:10000 a causa del minore tasso di amplificazione del ceppo *in vitro*. In questo set-up sperimentale, l'inoculo è stato prima sottoposto ad un evento a collo di bottiglia, e poi propagato attraverso passaggi ad ampia popolazione in modo da ristabilire la popolazione. La differente dimensione dei cerchi rossi, che rappresentano la PrP<sup>Sc</sup> amplificata *in vitro*, indica la differente diluizione di PrP<sup>Sc</sup> utilizzata.



**Figura 8. Tasso di amplificazione dei ceppi adattati all'arvicola v586 e SS21.** Diluizioni seriali del ceppo di BSE (v586) e Scrapie (SS21), entrambi adattati all'arvicola, sono state sottoposte ad un round di PMCA. I prodotti di ogni reazione sono stati digeriti con PK e analizzati in Western Blot. Per entrambi i ceppi, sono stati analizzati contestualmente i primi tre punti della curva di diluizione non soggetti ad amplificazione *in vitro*, in modo da determinare il fattore di amplificazioni. La PrP<sup>res</sup> è stata rivelata utilizzando l'anticorpo anti-PrP SAF84.

Quindi, allo scopo di mimare *in vitro* propagazioni delle popolazioni prioniche attraverso passaggi ad ampia popolazione, i 2 campioni di partenza per entrambi i ceppi in esame, v587 e SS21, sono stati seminati alla diluizione 1/10 in omogenati cerebrali di arvicola, e quindi replicati attraverso round consecutivi di PMCA, trasferendo ogni volta 1/10 della popolazione risultante dal precedente round. Parallelamente, tre campioni degli stessi inoculi di partenza sono stati seminati a diluizioni limitanti (1/10000000 per v587 ed 1/100000 per SS21) e replicati per diversi round consecutivi di PMCA alternando semine a forte diluizione e semine a bassa diluizione, queste ultime per evitare l'estinzione delle popolazioni (Fig. 7).

#### **4.2.2 Evoluzione del ceppo di BSE in repliche omologhe**

Data la comune origine delle popolazioni esaminate, le cinque popolazioni del ceppo di BSE adattato all'arvicola sono state identificate come v587/a e v587/b, entrambe sottoposte ad ampi passaggi di popolazione, e v587/c, v587/d e v587/e sottoposte al contrario a trasferimenti limitanti (colli di bottiglia). Per ogni popolazione analizzata, l'inoculo iniziale ed il prodotto di ogni round sono stati digeriti con Proteinasi K e la PrP<sup>res</sup> analizzata in Western Blot. Dopo 5 round di PMCA ed un fattore di replicazione pari a  $10^{20}$ , in nessuna popolazione sottoposta a colli di bottiglia è stata riscontrata alcuna modifica nel profilo elettroforetico della PrP<sup>res</sup>, nonostante due delle tre popolazioni mostrassero un decremento del segnale di PrP<sup>res</sup>, suggerendo quindi un decremento del tasso di replicazione del ceppo (Fig. 9A). Al contrario, in una delle popolazioni amplificate *in vitro* attraverso passaggi ad ampia popolazione, v586a, la PrP<sup>res</sup> identificata ha mostrato uno shift del profilo elettroforetico verso l'alto (Fig. 9A) evidenziabile fin dal secondo round di amplificazione in PMCA, cioè dopo un fattore di replicazione pari a  $10^2$ , e si è protratta fino al termine dell'esperimento.

Per confermare che la leggera differenza riscontrata nel peso molecolare della PrP<sup>res</sup> della popolazione v587/a fosse correlata ad un differente sito di taglio della Proteinasi K e conseguentemente ad una variazione conformazionale della PrP<sup>Sc</sup> stessa, tutti i campioni sono stati analizzati attraverso il WB discriminatorio modificato, basato sul riconoscimento del diverso taglio N-terminale della PrP<sup>Sc</sup> da parte della PK grazie all'uso di anticorpi che riconoscono epitopi nella regione della PrP soggetta ad idrolisi durante la digestione con PK, ed evidenziato grazie al calcolo del rapporto del segnale ottenuto con due anticorpi, come descritto nei materiali e metodi. In questo caso, gli anticorpi prescelti per



l'esperimento sono stati SAF84 e 12B2, poiché il ceppo v586 è caratterizzato da un sito di taglio della Proteinasi K più C terminale rispetto all'epitopo riconosciuto dall'anticorpo 12B2 (Cosseddu et al., 2011), quindi lo shift verso l'alto del profilo elettroforetico della popolazione v586/a doveva riflettere uno spostamento verso l'N terminale del sito di taglio riconosciuto dalla PK, e conseguentemente un incremento del segnale dell'anticorpo 12B2. Infatti, mentre le popolazioni v587/b, v587/c, v587/d e v587/e erano caratterizzate da un rapporto anticorpale SAF84/12B2 simile a quello dell'inoculo (v587), il rapporto anticorpale della popolazione v587/a si presentava molto più simile a quello di un ceppo di Scrapie classica, e completamente differente da quello della popolazione originaria (Fig. 9B e 9C).

#### 4.2.3. Evoluzione del ceppo di Scrapie in replicazioni omologhe

Lo stesso esperimento è stato condotto anche su un ceppo di scrapie adattata all'arvicola, SS21, ed è stato protratto per 9 round successivi di PMCA. Anche qui, data la comune origine, le cinque popolazioni analizzate sono state identificate come SS21/a e SS21/b, sottoposte a replicazione *in vitro* attraverso passaggi ad ampie popolazioni, e SS21/c, SS21/d e SS21/e replicate, invece, attraverso consecutivi colli di bottiglia. In modo inaspettato, due delle tre popolazioni amplificate attraverso colli di bottiglia risultavano a malapena identificabili in Western Blot dopo soli 5 rounds di PMCA, cioè dopo un fattore di amplificazione pari a  $10^{14}$ , ed addirittura negative al nono round (Fig. 10A), a indicazione di un forte decremento del tasso di replicazione del ceppo. Quindi, dopo nove rounds di PMCA, solamente tre popolazioni su cinque erano visualizzabili in Western Blot, due delle quali sottoposte ad una fattore di amplificazione del valore di  $10^9$  (SS21/a e SS21/b) e una ad un fattore pari a  $10^{24}$  (SS21/c). Anche in questo caso, mentre in nessuna popolazione sottoposta a colli di bottiglia è stato riscontrato alcun cambiamento della PrP<sup>res</sup>, è stato identificato un incremento del peso molecolare della PrP<sup>res</sup> di una popolazione replicata attraverso passaggi ad ampie popolazioni, SS21/a, e quindi uno shift verso l'alto del suo profilo elettroforetico (Fig. 10A).

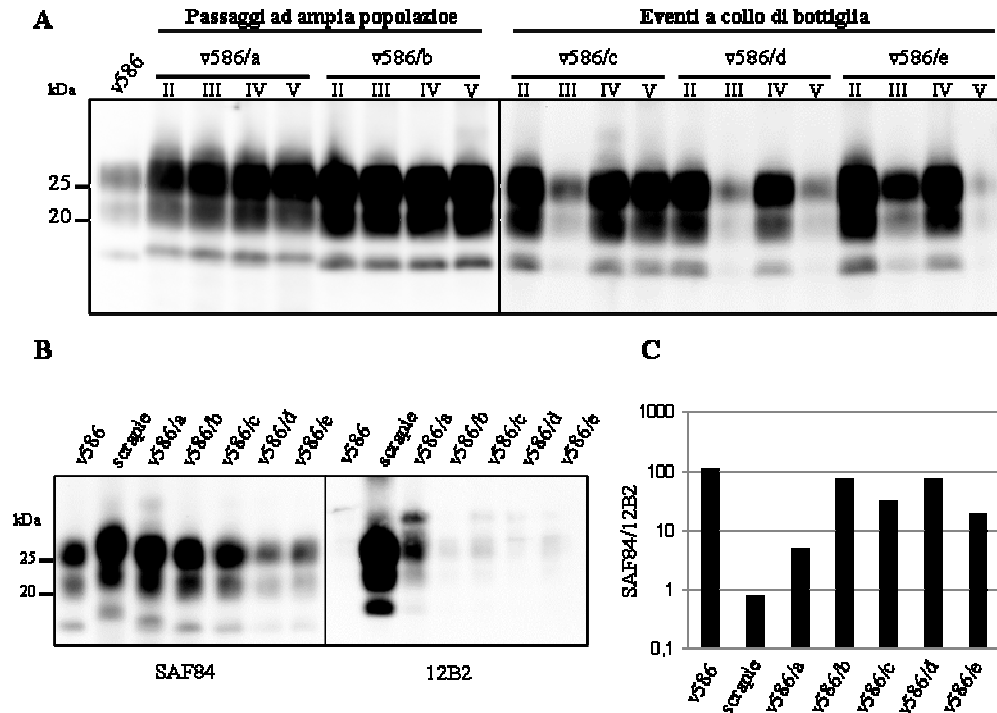
Poiché SS21/d e SS21/e sono state perse durante le replicazioni *in vitro*, l'ultimo round di PMCA in cui tutte le popolazioni risultavano amplificate, sulla base del segnale di PrP<sup>res</sup>, è stato utilizzato per compararne i rapporti anticorpali. In questo caso, poiché la PrP<sup>res</sup> dei ceppi di Scrapie adattata all'arvicola in seguito a digestione con Proteinasi K perde parzialmente l'epitopo dell'octa-repeat, riconosciuto dall'anticorpo SAF32, il rapporto di

anticorpi utilizzato è stato quello SAF84/SAF32 (Pirisinu et al., 2013). Il metodo discriminatorio ha confermato l'aumento del peso molecolare della PrP<sup>res</sup> della popolazione SS21/a, mostrando valori del rapporto SAF84/SAF32 decisamente minori rispetto a quelli delle altre popolazioni amplificate *in vitro* (Fig. 10B e 10C).

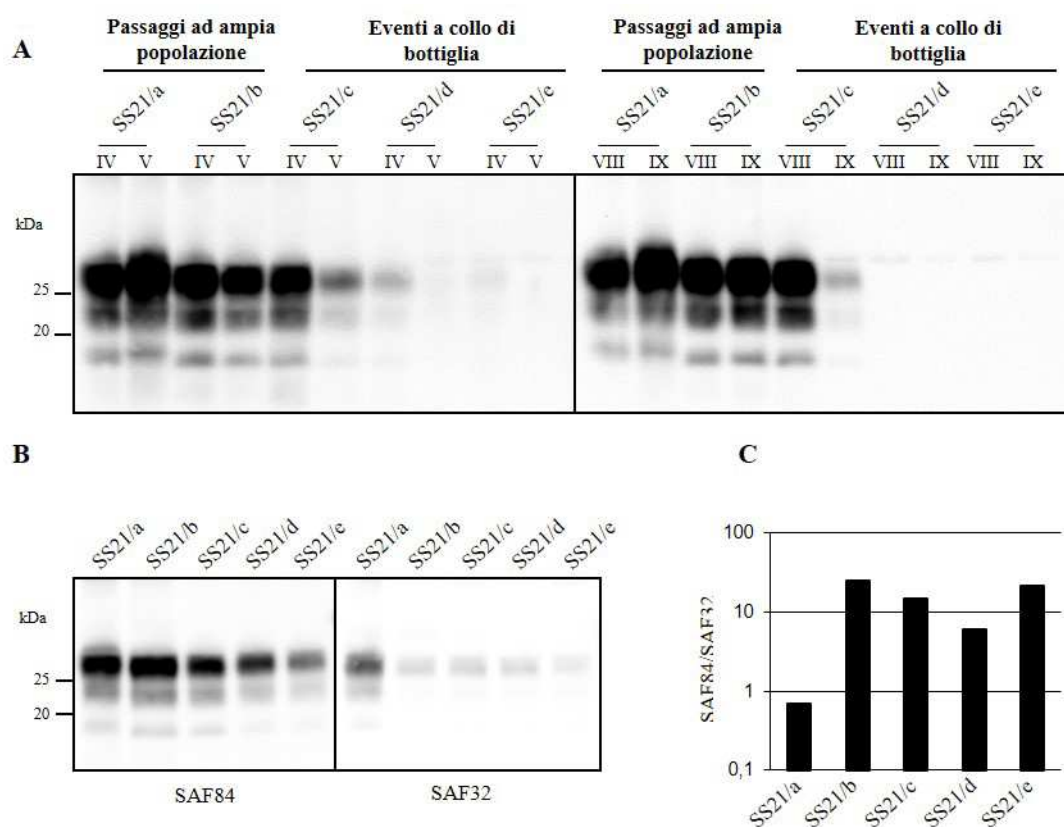
Per determinare con precisione la genesi del nuovo conformero di PrP<sup>Sc</sup> nella popolazione SS21/a, lo stesso approccio di tipizzazione molecolare è stato applicato a tutti e nove i rounds di PMCA consecutivi cui è stata sottoposta la popolazione. L'analisi ha mostrato come l'aumento del peso molecolare della PrP<sup>res</sup> e il decremento del rapporto anticorpale SAF84/SAF32 fossero evidenti già dal secondo round di PMCA, ma che sparissero al quarto e al sesto round, prima di essere apparentemente “fissati” al nono round di PMCA (Fig. 11A).

La PrP<sup>Sc</sup> della popolazione SS21/a amplificata nel nono round è stata quindi utilizzata come inoculo in nove reazioni di PMCA identiche e propagata per un ulteriore round *in vitro*. Sorprendentemente, il profilo molecolare del conformero mutante SS21/a è stato perso in due tubi su nove (Fig. 11B). Un risultato di questo tipo può essere spiegato ipotizzando un' amplificazione stocastica dei differenti conformeri oppure un equilibrio dinamico tra differenti sottopopolazioni di PrP<sup>Sc</sup> che compongono la popolazione SS21/a, con conformazioni leggermente diverse. In accordo con questa instabilità del mutante conformazionale, ogni tentativo di clonaggio della variante conformazionale di SS21/a è fallito.

Data l'inaspettata estinzione di due delle tre popolazioni propagate *in vitro* e sottoposte a consecutivi eventi a collo di bottiglia, per tutte le popolazioni SS21 è stato determinato il tasso di amplificazione *in vitro*. Per ogni popolazione è stato quindi scelto il prodotto di reazione dell'ultimo round di PMCA in cui si aveva amplificazione della PrP<sup>Sc</sup> a livelli detectabili in Western Blot, cioè il nono round per le popolazioni SS21/a, b e c e il quarto round per le popolazioni SS21/d ed e, e questo è stato utilizzato come inoculo per una curva di diluizione sottoposta ad un singolo round di PMCA. In accordo con i risultati ottenuti, l'amplificazione delle due popolazioni SS21/d e SS21/e si mostrava estremamente inefficiente, in quanto solamente nel primo punto della curva di diluizione,  $10^{-2}$ , era



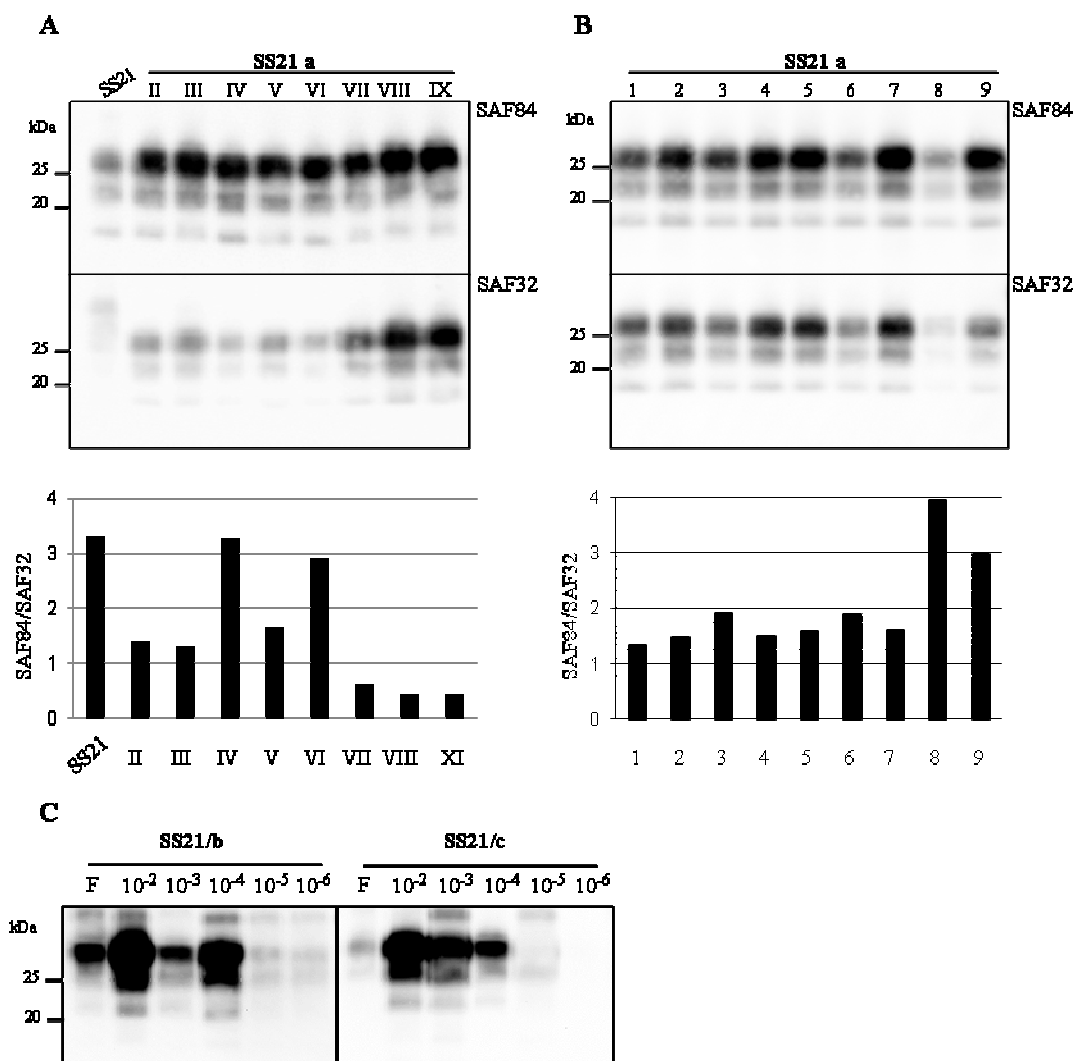
**Figura 9. Potenziale evolutivo del ceppo v586.** **A) Tipizzazione molecolare della PrP<sup>res</sup>.** Per ogni popolazione (v586/a, v586/b, v586/c, v586/d e v586/e) sono stati analizzati 4 rounds di PMCA (indicati in numeri romani) e la PrP<sup>res</sup> visualizzata con l'anticorpo anti-PrP SAF84. Le popolazioni v586/c, v586/d e v586/e mostravano una debole amplificazione nei round dispari (III e V), amplificazione ristabilita nei rounds pari (II e IV). Uno shift verso l'alto del profilo elettroforetico della PrP<sup>res</sup> della popolazione SS21/a, propagata attraverso ampi passaggi di popolazione, era evidente fin dal secondo round. **B) Epitope mapping.** La PrP<sup>Sc</sup> delle cinque popolazioni, v587/a e v587/b amplificate attraverso ampi passaggi di popolazione, e v587/c, v587/d e v587/e, amplificate attraverso successivi eventi a collo di bottiglia, è stata digerita con PK alla concentrazione di 200 µg/ml e le membrane analizzate con l'anticorpo anti-PrP C-terminale SAF84 e l'anticorpo anti-PrP N-terminale 12B2. L'inoculo iniziale è stato aggiunto all'analisi insieme ad un campione di Scrapie. La popolazione v587/a mostrava un profilo elettroforetico di PrP<sup>res</sup> intermedio tra quello dell'inoculo e quello del campione di Scrapie, mantenendo l'epitopo riconosciuto dall'anticorpo 12B2. **C) Analisi semiquantitativa del rapporto anticorpale.** Per ogni popolazione il rapporto del segnale di chemio-luminescenza degli anticorpi SAF84 e 12B2 è stato quantificato usando il software QuantityOne. L'inoculo e il campione di scrapie sono stati aggiunti ed utilizzati come controlli. Di nuovo, la popolazione v587/a mostrava un valore di rapporto anticorpale significativamente differente da quello dell'inoculo.



**Figura 10. Potenziale evolutivo del ceppo SS21.** **A) Tipizzazione molecolare della PrP<sup>res</sup>.** Per ogni popolazione (SS21/a, SS21/b, SS21/c, SS21/d e SS21/e) sono stati analizzati il quarto, quinto, ottavo e nono round di PMCA (indicati in numeri romani), e la PrP<sup>res</sup> analizzata con anticorpo anti-PrP SAF84. Le popolazioni SS21/d e SS21/e mostravano una scarsa amplificazione nei rounds dispari, non ristabilita nei rounds pari; le due popolazioni sono state infatti perse al nono round di PMCA. La popolazione SS21/c, invece, è stata mantenuta, nonostante fosse stata sottoposta alle stesse condizioni di amplificazione. Uno shift verso l'alto del peso molecolare della PrP<sup>res</sup> della popolazione SS21/a è stato identificato dal quarto round di PMCA. **B)** La PrP<sup>Sc</sup> delle cinque popolazioni, v587/a e v587/b amplificate attraverso ampi passaggi di popolazione, e v587/c, v587/d e v587/e, amplificate attraverso successivi eventi a collo di bottiglia, è stata digerita con PK alla concentrazione di 200 µg/ml e le membrane analizzate con l'anticorpo anti-PrP C-terminale SAF84 e l'anticorpo anti-PrP N-terminale SAF32. La popolazione SS21/a manteneva l'epitopo riconosciuto dall'anticorpo SAF32, al contrario di tutte le altre popolazioni. **C) Analisi semiquantitativa del rapporto anticorpale.** Per ogni popolazione il rapporto del segnale di chemio-luminescenza degli anticorpi SAF84 e SAF32 è stato quantificato usando il software QuantityOne. Di nuovo, la popolazione SS21/a mostrava un rapporto anticorpale differente da quello delle altre popolazioni amplificate *in vitro*.

presente PrP<sup>res</sup>, caratterizzata da un segnale di chemio-luminescenza estremamente basso. Delle tre popolazioni mantenute dopo tutti e nove i rounds, SS21/a e SS21/b mostravano un tasso di amplificazione simile, o addirittura maggiore di quello dell'inoculo originale. Infatti, tutti e tre i campioni, quando utilizzati come inoculo in PMCA, risultavano amplificabili fino alla diluizione 10<sup>-5</sup>, con un incremento di un fattore di diluizione per la popolazione SS21/b (Fig. 11C). Al contrario, la popolazione SS21/c, la più efficiente delle tre popolazioni propagate *in vitro* attraverso colli di bottiglia, risultava caratterizzata da un fattore di amplificazione minore, di almeno cento volte, rispetto a quello dell'inoculo SS21 originale (Fig. 11C). Quindi, indipendentemente dall'emergenza di mutanti conformazioni identificabili attraverso il Western Blot discriminatorio, una notevole riduzione della fitness dell'agente infettante risulta associata a propagazioni in cui la popolazione è soggetta a eventi a collo di bottiglia, che riducono il numero delle "particelle infettanti".

Come detto in precedenza, diversi esperimenti hanno riportato che l'uso di molecole, a presunta attività anti-prionica, *in vivo* ed *ex vivo*, possa indurre l'emergenza di varianti di PrP<sup>Sc</sup> drug-resistant (*Prusiner et al., 2009; Telling et al., 2014*). I risultati appena mostrati indicano come la capacità di modificarsi in risposta all'ambiente sia una proprietà intrinseca dei ceppi di prioni, e soprattutto che sia possibile utilizzare tecniche di amplificazione *in vitro*, veloci, economiche e attendibili per investigare questa mutabilità. Per questo motivo, scopo dell'ultima parte del dottorato è stato impostare un saggio in PMCA capace di discriminare molecole ad azione anti-prionica e verificare l'induzione di eventi di mutazione/selezione.



**Figura 11. Analisi del potenziale evolutivo della popolazione SS21/a. A) Tipizzazione molecolare della PrP<sup>Sc</sup>.** La PrP<sup>Sc</sup> amplificata in ognuno dei nove rounds di PMCA (indicati dai numeri romani) cui è stata sottoposta la popolazione SS21/a, è stata digerita con PK e analizzata in Western Blot. L'analisi della PrP<sup>res</sup> condotta con gli anticorpi anti-PrP SAF84 e SAF32 ha mostrato una fluttuazione del profilo elettroforetico della PrP<sup>res</sup> tra i diversi rounds. L'analisi semi-quantitativa del rapporto anticorpale (nella parte bassa della figura) ha confermato che il campione SS21/a proveniente dal nono round di PMCA fosse differente dall'inoculo, e la fluttuazione della variante conformazionale di PrP<sup>Sc</sup> dominante durante l'amplificazione *in vitro*. **B) Propagazione della variante conformazionale di PrP<sup>Sc</sup> SS21/a.** Il campione SS21/a del nono round è stato diluito 1:100 in 9 tubi, poi sottoposti ad un round di PMCA. I prodotti di reazione sono stati digeriti con PK, analizzati in WB, e la PrP<sup>res</sup> visualizzata con gli anticorpi SAF84 e SAF32. Nonostante lo stesso inoculo, la PrP<sup>res</sup> amplificata nei tubi 8 e 9 mostrava un diverso profilo elettroforetico. L'analisi semi-quantitativa del rapporto anticorpale ha confermato la presenza di un differente tipo di PrP<sup>res</sup> nei tubi 8 e 9. **C) Tasso di amplificazione *in vitro*.** Una curva di diluizione è stata prodotta dalle popolazioni SS21/b e SS21/c amplificate nel nono round di PMCA, successivamente sottoposta ad un round di PMCA. I prodotti sono stati digeriti con PK, analizzati in WB e la PrP<sup>res</sup> visualizzata con l'anticorpo anti-PrP SAF84. SS21/b manteneva un tasso di amplificazione *in vitro* comparabile a quello dell'inoculo originale, con la diluizione 10<sup>-6</sup> come ultima visualizzabile in WB. Invece, la PrP<sup>res</sup> della popolazione SS21/c risultava amplificabile solo fino alla diluizione 10<sup>-4</sup>. Per entrambe le popolazioni, all'analisi è stato aggiunto l'inoculo alla diluizione 10<sup>-2</sup>.

### **4.3. Mutabilità dei prioni in risposta a molecole terapeutiche: PMCA come tecnica discriminatoria per molecole ad azione anti-prionica**

Grazie alla collaborazione con il laboratorio di Neurobiologia dei Prioni dell'Istituto Mario Negri di Milano, è stata valutata la capacità di inibizione dell'amplificazione dei prioni *in vitro* di 8 molecole: due, il Congo Rosso (CR) ed il Tetrapirrolo (TTP), la cui azione come molecole anti-prionica *ex vivo* e *in vitro* è riportata in letteratura (Nicoll *et al.*, 2010; Caughey *et al.*, 1993), altre la cui azione in PMCA non è mai stata investigata, come la Clorpromazina (CPM) e il DS26 (Biasini *et al.*, 2014), ed infine alcune molecole sintetizzate *ex novo* dopo analisi *in silico* per la capacità di legare la PrP<sup>C</sup>, denominate, SM54, SM74 e SM84 (Biasini *et al.*, 2014) e Bnf, una porfirina con struttura simile al Tetrapirrolo.

L'abilità dei prioni di modificarsi in risposta all'ambiente di replicazione, anche in risposta a trattamenti con molecole ad azione anti-prionica, pone dei limiti allo studio e all'uso di molecole terapeutiche, principalmente in considerazione del target di azione delle molecole stesse. Infatti, molecole anti-prioniche che agiscono direttamente sulla PrP<sup>Sc</sup> sono considerate più prone ad instaurare fenomeni di resistenza, grazie all'emersione di varianti conformazionali della PrP<sup>Sc</sup> che sfuggono al legame con le molecole in questione. Sulla base di queste considerazioni, ad eccezione del Congo Rosso, dalle note proprietà di legame per la PrP<sup>Sc</sup>, tutte le altre molecole testate mostrano affinità di legame per la PrP<sup>C</sup>. In questo modo, non solo è stato possibile verificare l'abilità inibente delle suddette molecole *in vitro*, ma anche investigare la capacità dei prioni di mutare in risposta a molecole che non agiscono sull'agente infettante ma sull'ospite. Chiaramente, per comparare l'azione di molecole con diverso bersaglio ed escludere un'eventuale azione sequenza-dipendente, tanto la PrP<sup>C</sup> (substrato) quanto la PrP<sup>Sc</sup> (inoculo) utilizzate nel saggio di PMCA sono derivate da arvicola rossastra.

#### **4.3.1. Set up sperimentale**

Allo scopo di rendere veloce ma al tempo stesso efficiente l'analisi, il ceppo di Scrapie italiana utilizzato come inoculo per testare la capacità di inibizione è stato diluito 1:100 in omogenato cerebrale di arvicola e congelato (Frozen) o sottoposto, in triplicato, a un round di PMCA composto da soli 32 cicli, per un totale di 16 ore di amplificazione *in vitro*. Le stesse diluizioni dell'inoculo sono state effettuate in omogenati cerebrali adulterati,

contenenti singolarmente le molecole CR, TTP, CPM, Bnf, DS26, SM54, SM74 e SM84 alla concentrazione di 500  $\mu$ M. I prodotti di reazione, insieme alla curva standard, sono stati quindi digeriti con Proteinasi K e la PrP<sup>res</sup> visualizzata in Western Blot.

Il grado di inibizione delle molecole è stato quindi valutato comparando i fattori di amplificazione del ceppo in presenza e assenza della molecola. Nel caso di CR, TTP, CPM, DS26 e Bnf, tutti diluiti in acqua, il solo substrato di arvicola non manipolato è stato utilizzato per determinare l'amplificazione in assenza delle molecole, mentre per le tre molecole SM54, SM74 e SM84, insolubili in acqua e diluite in DMSO, la stessa quantità di DMSO presente come diluente nei substrati adulterati è stata aggiunta all'omogenato cerebrale di arvicola.

### **4.3.2. Identificazione delle molecole ad azione inibitoria in PMCA**

#### **4.3.2.1. SM54, SM74 e SM84**

Come detto, a causa della loro insolubilità in acqua, le molecole SM54, SM74 e SM84 sono state diluite in DMSO. In ogni esperimento, il ceppo di Scrapie è stato utilizzato come inoculo in 15 diverse reazioni di PMCA; tra queste, tre presentavano substrato di arvicola tal quale, tre substrato in presenza di DMSO e le altre, sempre in triplicato, contenevano le molecole da testare. L'analisi della PrP<sup>res</sup> e il fattore di amplificazione hanno mostrato innanzitutto come il DMSO avesse un parziale effetto inibitorio sull'amplificazione *in vitro* della PrP<sup>Sc</sup>; infatti, mentre con 32 cicli di replicazione *in vitro* su substrato tal quale il ceppo di Scrapie italiana mostrava, come atteso, un fattore di amplificazione medio di 10, lo stesso ceppo in presenza di DMSO era caratterizzato da un fattore di amplificazione medio di 5 (Fig. 12A). Dovendo quindi comparare l'amplificazione del ceppo di scrapie in presenza delle molecole con quella in presenza del solo DMSO, due delle tre molecole testate, rispettivamente SM54 e SM74, hanno mostrato una totale assenza di inibizione. La PrP<sup>res</sup> amplificata in presenza della molecola presentava le stesse caratteristiche dell'inoculo e il fattore di amplificazione osservato risultava uguale (SM54) a quello ottenuto in presenza del solo DMSO, o addirittura maggiore (SM74). L'amplificazione del ceppo di Scrapie italiana in presenza della molecola SM84, invece, risultava leggermente meno efficiente di quella con il solo vettore, con un fattore di amplificazione medio pari a 4 (Fig. 12A). In considerazione del fatto che il DMSO da solo determinava un decremento del fattore di amplificazione di circa la metà,



l'ulteriore inibizione data dalla molecola, per giunta utilizzata a concentrazioni elevate, non è stata considerata significativa.

#### **4.3.2.2. Congo Rosso, Clorpromazina e DS26**

La stessa analisi è stata condotta sulle molecole Clorpromazina e DS26, entrambe aventi PrP<sup>C</sup> come target, e Congo Rosso, del quale sono invece riportate affinità di legame per gli aggregati di PrP<sup>Sc</sup> ed azione inibente *ex vivo* e *in vivo* (Caughey *et al.*, 1993; Corato *et al.*, 2009). Anche in questo caso il ceppo di Scrapie italiana è stato diluito 1:100 in triplicato in substrato di arvicola tal quale o adulterato, e l'analisi è stata ripetuta tre volte. Tutte e tre le molecole, anche se con differente target di azione, non hanno mostrato alcun tipo di inibizione dell'amplificazione del ceppo esaminato. Infatti, non è stata riscontrata nessuna differenza tra i fattori di amplificazione calcolati in presenza o in assenza delle molecole (Fig. 12B). Studi *ex vivo* e strutturali hanno mostrato come la Clorpromazina, un principio attivo neurolettico appartenente al gruppo delle Fenol tiazine con dimostrato legame alla PrP<sup>C</sup> (Baral *et al.*, 2013), sia capace di inibire l'accumulo di PrP<sup>Sc</sup>, agendo sulla redistribuzione della PrP<sup>Sc</sup> stessa (Korth *et al.*, 2001), ma si è dimostrata inefficace quando usata in combinazione con Quinacrina in trattamenti di pazienti affetti da FFI (Benito-Leòn, 2004). In accordo con gli insuccessi riportati *in vivo*, il ceppo di Scrapie amplificato *in vitro* in presenza di Clorpromazina ha mostrato una efficienza di replicazione pari a quella osservata su substrato di arvicola tal quale, con un fattore di amplificazione medio pari a 10. Stesso risultato è stato ottenuto con la molecola DS26. Analogamente, nessun tipo di inibizione nell'amplificazione del ceppo di Scrapie è stata osservata in presenza del Congo Rosso, la cui inibizione dell'accumulo di PrP<sup>Sc</sup> è stata precedentemente riportata in esperimenti *ex vivo* e *in vivo*, anche se con effetto parziale (Caughey *et al.*, 1993).

#### **4.3.2.3. Tetrapirrolo e Bnf**

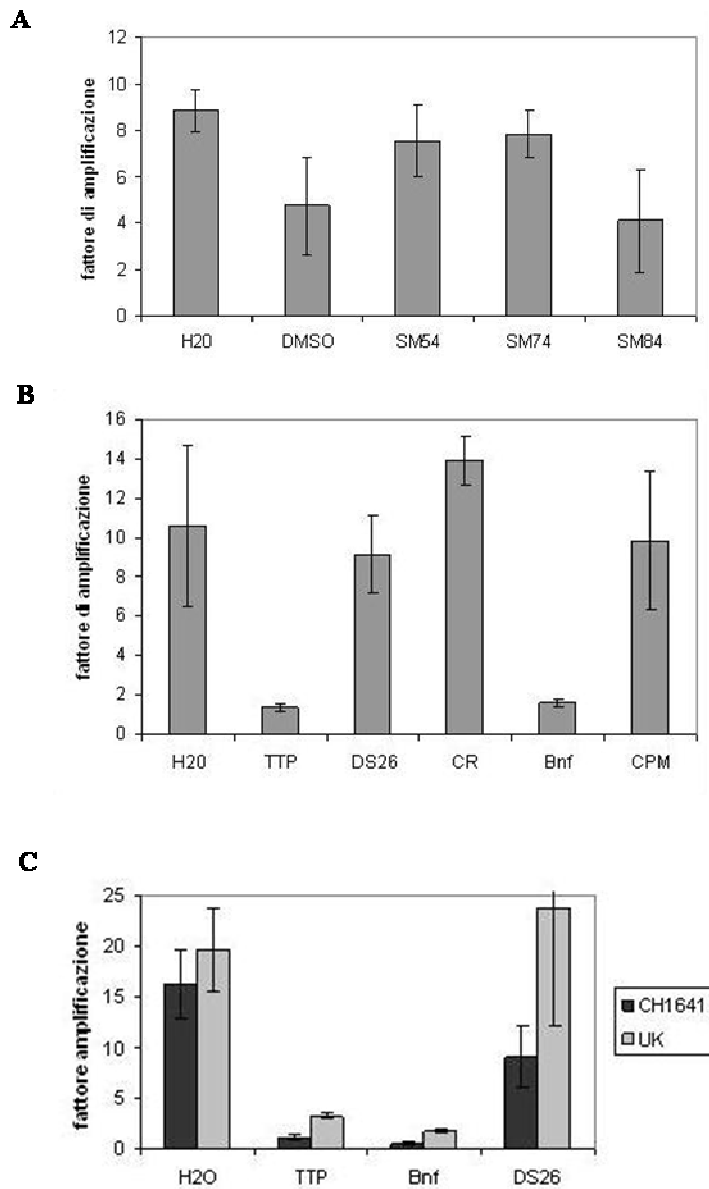
L'analisi condotta su Tetrapirrolo e Bnf, porfirina con struttura analoga al TTP, ha mostrato risultati diversi. Entrambe le molecole, infatti, alla concentrazione di 500  $\mu$ M determinavano una inibizione totale del ceppo di scrapie italiana in PMCA, mostrando rispettivamente un fattore di amplificazione medio di 1.3 e 1.5 (Fig. 12B).

L'attività inibente delle due porfirine è stata quindi valutata su altri due ceppi di Scrapie,

un ceppo inglese (UK) e un ceppo CH1641-like, adattati *in vivo* all'arvicola. Entrambi i ceppi sono stati diluiti 1:100 in triplicato su substrato di arvicola tal quale o in presenza della molecola, e sottoposti ad un round di PMCA di 32 cicli. I due ceppi mostrano una propria distintiva efficienza di replicazione *in vitro*, replicazione però inibita dalle due porfirine, con la Bnf a determinare il maggiore grado di inibizione. Inoltre, dei tre ceppi di scrapie analizzati, il ceppo CH1641-like sembrava essere quello più affetto dall'azione delle due molecole, con valori di fattore di amplificazione medio pari a 1.1 e 0.5 rispettivamente in presenza di TTP e Bnf (Fig. 12C). Il ceppo di Scrapie inglese, pur mostrando un tasso di amplificazione significativamente ridotto, risultava caratterizzato da fattori di amplificazione *in vitro* pari a 3.1 e 1.7 (Fig. 12C).

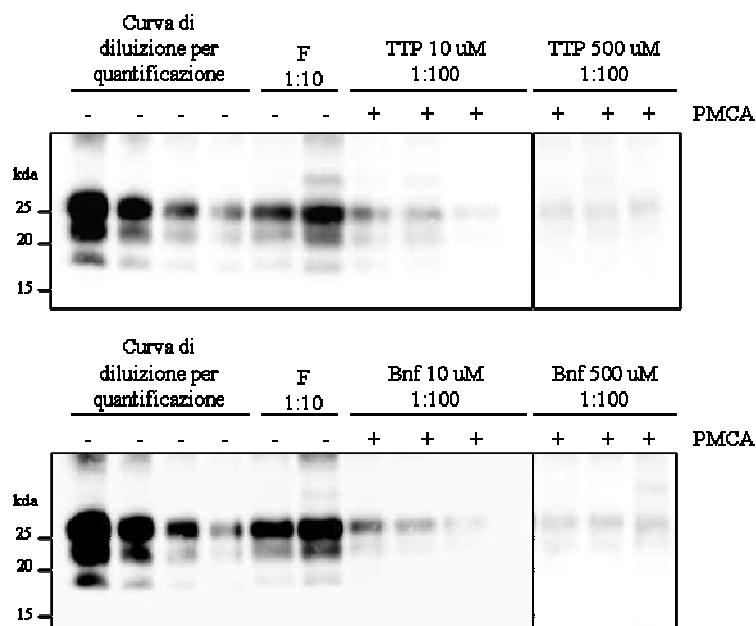
Allo scopo di determinare la EC50 delle due porfirine sono stati condotti esperimenti di dose-risposta *in vitro*. Lo stesso schema sperimentale utilizzato inizialmente per valutare la capacità d'inibizione delle molecole selezionate, è stato quindi usato per valutare la concentrazione di Tetrapirrolo e Bnf alla quale si osservava un effetto pari al 50% dell'efficacia. Assodato che i diversi tipi di Scrapie ovina fossero inibiti allo stesso modo, il ceppo di Scrapie italiana è stato scelto come modello e così sottoposto ad amplificazione *in vitro* in 5 diverse condizioni di substrato: tal quale, Tetrapirrolo alla concentrazione di 1, 5, 10, 50 e 100  $\mu\text{M}$ . Ogni condizione è stata analizzata in triplicato, e la stessa analisi effettuata anche per la molecola Bnf. Dall'analisi è emerso che entrambe le molecole mostrano un effetto di inibizione fino a concentrazioni di 10  $\mu\text{M}$  (Fig. 13), confermando la similitudine precedentemente osservata in efficienza e potenza.

Lo studio della PrP<sup>Sc</sup> amplificata *in vitro* in presenza di Bnf ha mostrato che i campioni di Scrapie classica, italiana e inglese, trattati con Bnf mostravano un profilo elettroforetico della PrP<sup>res</sup> diverso rispetto all'originale (Fig. 14). Infatti, tutti i prodotti delle reazioni di PMCA condotte in presenza di Bnf alla concentrazione di 500  $\mu\text{M}$  erano caratterizzati da uno shift verso l'alto del peso molecolare della PrP<sup>res</sup> di circa 1 kDa (Fig. 14). Per verificare se lo shift fosse dovuto alla sola molecola o all'amplificazione in PMCA, Bnf alla concentrazione di 1, 5, 10, 50, 100 e 500  $\mu\text{M}$  è stata aggiunta all'inoculo di Scrapie, e il campione risultante è stato successivamente incubato per 30', digerito con Proteinasi K e analizzato in Western Blot. Dall'analisi è emerso come lo shift del profilo elettroforetico avvenisse anche in campioni non sottoposti ad amplificazione *in vitro*, e che fosse concentrazione dipendente; infatti, il cambiamento nel peso molecolare risultava evidente a partire dalla concentrazione di 50  $\mu\text{M}$  (Fig. 15). Al contrario, nessuna modifica molecolare è stata identificata sulla PrP<sup>C</sup>, anche a concentrazioni elevate di Bnf. (Fig.15). Questi

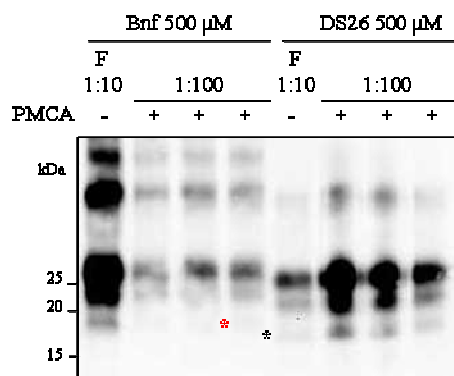


**Figura 12. Attività inibitoria delle molecole ad azione anti-prionica.** Il ceppo di Scrapie classica italiana è stato diluito 1:00 su substrato di arvicola rossastra tal quale, in presenza di DMSO, delle molecole SM54, SM74 e SM84 (A), o TTP, DS26, CR, Bnf e CPM (B) alla concentrazione di 500  $\mu$ M. Tutte le reazioni sono state condotte in triplicato. La PrP<sup>Sc</sup> amplificata in PMCA è stata digerita con PK e poi analizzata in WB, visualizzando la PrP<sup>res</sup> con l'anticorpo anti-PrP SAF84. Utilizzando il software QuantityOne è stato calcolato il segnale di chemio-luminescenza per ogni campione, e il fattore di amplificazione del ceppo calcolato attraverso l'equazione: (PrP<sup>res</sup> amplificata in PMCA)/(PrP<sup>res</sup> dell'inoculo)\*fattore di diluizione. La molecola SM84 mostrava un effetto di inibizione, determinando un decremento del fattore di amplificazione del ceppo fino ad un valore di 4, simile però a quello determinato dal solo DMSO, vettore della molecola. Un elevato potere inibente *in vitro* caratterizzava invece TTP e Bnf, in presenza delle quali il ceppo di Scrapie mostrava valori del fattore di amplificazione rispettivamente di 1.4 e 1.6. C) **Studio della capacità inibente di TTP e Bnf su altri ceppi di Scrapie.** La stessa analisi è stata condotta su altri due ceppi di Scrapie, una Scrapie classica inglese e CH1641-like. Entrambi ceppi risultavano inibiti nell'amplificazione *in vitro* da TTP e Bnf, con fattori di amplificazione pari a 3.2 e 1.7 per il ceppo di Scrapie inglese, e 1.1 e 0.5 per il CH1641-like.

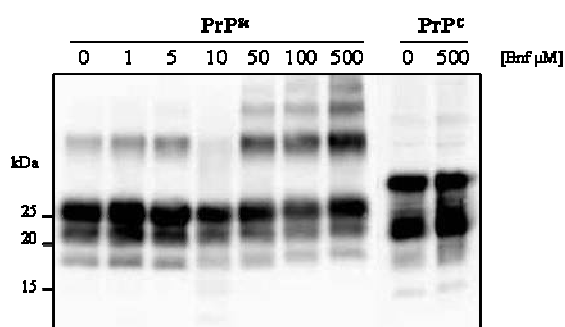
risultati escludono che la variazione di peso molecolare della PrP<sup>res</sup> osservata rappresenti un evento mutazionale come quelli evidenziati nei precedenti esperimenti, poiché l'effetto del Bnf è risultato indipendente dall'amplificazione della PrP<sup>Sc</sup>. Al contrario, nonostante il meccanismo di azione atteso per Bnf coinvolga un legame con la PrP<sup>C</sup> e non con la PrP<sup>Sc</sup>, l'aumento del peso molecolare identificato sembra essere compatibile con il legame di una molecola di Bnf all'aggregato di PrP<sup>Sc</sup>.



**Figura 13. Analisi della capacità di inibizione delle molecole TTP e Bnf a due diverse concentrazioni.** Il ceppo di Scrapie classica italiana è stato diluito 1:100 su substrato di arvicola rossastra tal quale o in presenza delle molecole TTP (in alto) e Bnf (in basso) alla concentrazione di 10 e 500  $\mu$ M. Tutte le reazioni sono state condotte in triplicato. La PrP<sup>Sc</sup> amplificata in PMCA è stata digerita con PK e poi analizzata in WB, insieme ad una curva di diluizione di un campione di Scrapie (parte a sinistra di ogni blot) utilizzata per quantificare la PrP<sup>Sc</sup> amplificata. L'anticorpo anti-PrP SAF84 è stato utilizzato per visualizzare la PrP<sup>res</sup>. Sia TTP che Bnf aggiunte al substrato alla concentrazione di 500  $\mu$ M confermavano l'azione di inibizione dell'amplificazione *in vitro*. Risultato comparabile è stato ottenuto utilizzando le molecole alla concentrazione di 10  $\mu$ M, concentrazione alla quale il ceppo mostrava un fattore di amplificazione rispettivamente di 1.8 e 2.



**Figura 14. Cambiamento del profilo elettroforetico della PrP<sup>Sc</sup> amplificata *in vitro* in presenza di Bnf.** Il ceppo di Scrapie classica inglese è stato diluito 1:00 su substrato di arvicola rossastra in presenza delle molecole Bnf (a sinistra) e DS26 (a destra) alla concentrazione di 500  $\mu$ M. Le reazioni sono state condotte in triplicato. La PrP<sup>Sc</sup> amplificata in PMCA è stata digerita con PK e poi analizzata in WB, insieme al Frozen (F 1:10), cioè l'inoculo diluito 1:10 in omogenato cerebrale di arvicola in presenza di Bnf o DS26 e non sottoposto ad amplificazione *in vitro*. L'anticorpo anti-PrP SAF84 è stato utilizzato per visualizzare la PrP<sup>res</sup>. Come indicato attraverso gli asterischi in figura, Bnf induce non solo una inibizione della replicazione *in vitro*, ma determina uno shift del peso molecolare della PrP<sup>res</sup> verso l'alto (asterisco rosso) rispetto a quanto osservato in presenza di DS26 (asterisco nero) e in assenza di trattamenti con molecole.



**Figura 15. Analisi del legame Bnf-PrP.** Il campione di scrapie classica italiana è stato incubato per 30' a 37°C con concentrazioni crescenti (0, 1, 5, 10, 50, 100, 500) di Bnf. Il campione così trattato è stato digerito con PK, analizzato in WB e la PrP<sup>res</sup> visualizzata con l'anticorpo anti-PrP SAF84. L'analisi del profilo elettroforetico della PrP<sup>res</sup> ha mostrato uno shift del peso molecolare della PrP<sup>res</sup>, e un aumento del segnale di aggregati di PrP<sup>res</sup>, concentrazione-dipendente, a partire da concentrazioni di Bnf pari a 50  $\mu$ M. L'aumento di peso molecolare diventava più marcato in presenza di Bnf 500  $\mu$ M, mostrando un aumento pari a circa 1 kDa. Nessuna modifica del profilo elettroforetico è invece identificata sulla PrP<sup>c</sup>, nemmeno a concentrazioni elevate di Bnf (parte destra del blot).

## 5. DISCUSSIONE

Le encefalopatie spongiformi trasmissibili sono considerate delle malattie non convenzionali. Nonostante la diversa origine, tutte le malattie da prioni risultano trasmissibili sperimentalmente, e caratterizzate da un agente infettante di natura esclusivamente proteica, derivante da una transconformazione patologica di una proteina cellulare dell'ospite. Inoltre, è ormai accettata l'esistenza di ceppi di prioni, cioè isolati infettivi caratterizzati da propri e differenti fenotipi clinico-patologici e differenti conformazioni di PrP<sup>Sc</sup>. A queste peculiari caratteristiche, si è recentemente aggiunta un'ulteriore caratteristica, forse la più non convenzionale in assoluto, e cioè la capacità dei ceppi di prioni di mutare. In alcuni casi, infatti, in seguito a trasmissioni sperimentali, il ceppo non si riproduce fedelmente ma risulta diverso dall'originale, quindi mutato, e spesso accompagnato da evidenti variazioni conformazionali della PrP<sup>Sc</sup> (Bruce 1993 e 2003; Bruce *et al.*, 1991 e 1994; Bessen & Marsh 1994). Recenti esperimenti condotti su linee cellulari (Mahal *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2010), hanno portato a spiegare l'emergenza di nuovi conformeri considerando i ceppi di prioni come una nuvola di differenti conformazioni di PrP<sup>Sc</sup> o quasi-specie, caratterizzata da un tipo di PrP<sup>Sc</sup> dominante del quale riconosciamo le caratteristiche biochimiche e biologiche e da innumerevoli altri tipi di PrP<sup>Sc</sup> minoritari non rilevabili, ma che possono essere selezionati e propagati differenzialmente in diversi ambienti di replicazione, portando così alla mutazione. Come altri patogeni, i prioni mostrerebbero quindi i segni tipici dell'evoluzione Darwiniana, in quanto soggetti ad eventi di selezione e mutazione, e la stessa mutabilità sarebbe una loro proprietà intrinseca. Nel contesto dei prioni però, i fenomeni di mutazione non possono ascrivere a variazioni degli acidi nucleici, essendone essi privi, quanto piuttosto alla generazione di varianti conformazionali della PrP<sup>Sc</sup> che, in un contesto in cui è la conformazione a preservare e trasmettere le proprietà ceppo-specifiche, si comporterebbero come il materiale genetico dei prioni.

Studi di questo tipo condotti *ex vivo*, però, sono limitati dalla tecnica stessa: le linee cellulari utilizzate sono spesso epiteliali, quindi non rappresentative del vero ambiente replicativo dei prioni, e suscettibili ad un limitato numero di ceppi di prioni, esclusivamente murini. Al contrario di quanto accade durante esperimenti *ex vivo*, è ormai largamente accettata la capacità del PMCA di riprodurre *in vitro* numerosi aspetti della biologia dei prioni, tra cui il fenomeno della selezione e mutazione dei ceppi (Castilla *et al.*, 2008). E' probabile che l'ambiente presente nelle reazioni di PMCA offra meno vincoli alla replicazione dei prioni, mancando una attiva clearance e divisione cellulare che

giocano un ruolo centrale nella selezione dei conformeri di PrP<sup>Sc</sup> nei modelli *ex vivo*. Per questo motivo e a seguito della casuale osservazione dell'emergenza di un mutante conformazionale di PrP<sup>Sc</sup> durante amplificazioni eterologhe pecore-arvicola, il PMCA ci è apparso come una tecnica appropriata e funzionale per investigare il fenomeno della mutabilità dei prioni. Nella serie di esperimenti descritti sopra abbiamo tentato di sfruttare le caratteristiche del PMCA per investigare *in vitro* e in condizioni controllate il potenziale mutageno dei prioni, ed in particolare della Scrapie, in diverse condizioni sperimentali.

Il primo approccio utilizzato, replicazione eterologa risultante dall'interazione tra la PrP<sup>Sc</sup> ovina e la PrP<sup>C</sup> dell'arvicola, mima la trasmissione dei prioni tra due specie diverse, ovvero il contesto sperimentale in cui, *in vivo*, è più facile osservare fenomeni di mutazione dei prioni. In queste condizioni è stato possibile isolare un mutante conformazionale, definito 14K, emerso ripetutamente solo nelle amplificazioni "seminate" con quantità limitanti di Scrapie ovina, mentre in tutte le altre condizioni il tipo molecolare riprodotto *in vitro* era identico all'originale (18K).

Le analisi biochimiche utilizzate di routine per la tipizzazione molecolare dei ceppi (mobilità elettroforetica dei frammenti di PrP<sup>res</sup>, sito di taglio di Proteinasi K, stabilità conformazionale della PrP<sup>Sc</sup> in presenza di agenti caotropici) hanno confermato la differente conformazione dei due tipi di PrP<sup>Sc</sup>, suggerendo quindi che si trattasse di due ceppi differenti. Il bioassay condotto su arvicole rossastre ha però mostrato che, mentre 18K rappresenta una replicazione fedele del ceppo ovino originario, 14K non è patogeno in arvicola, né è capace di replicarsi *in vivo*. Come detto, conformeri di PrP<sup>Sc</sup> con differente fenotipo biochimico e clinico-patologico sono classificati come differenti ceppi di prioni; per quanto 18K e 14K mostrino differenti caratteristiche molecolari e clinico-patologiche, in questo caso non è possibile parlare di ceppi di prioni diversi, poiché caratteristica *sine qua non* per definire un prione è l'infettività, caratteristica che 14K non possiede. L'inusuale assenza di infettività di 14K potrebbe far ipotizzare che questo conformero sia in realtà un artefatto creato in PMCA. Tuttavia il suo evidente potenziale auto-catalitico, unito al fatto che nulla di simile è emerso nei controlli negativi, spinge a considerare questa ipotesi come poco plausibile. Un'altra ipotesi più plausibile è che il PMCA semplicemente offra un ambiente di replicazione in cui è presente una pressione selettiva minore, e che quindi il tasso di replicazione del conformero di PrP<sup>Sc</sup> 14K *in vitro*, ma non *in vivo*, sia sufficientemente elevato da permetterne la propagazione. In queste condizioni di PMCA emergerebbe la capacità autocatalitica di 14K, mutante di prione difettivo. Diverse sono le ipotesi per spiegare la genesi di 14K. L'emergenza del conformero mutante da un solo

isolato di Scrapie ovina rende improbabile che questa emergenza sia stata indotta da differenze nella sequenza primaria della PrP<sup>C</sup> dell'ospite, l'arvicola, e del donatore, la pecora. E' altrettanto improbabile che sia avvenuta una generazione del conformero *de novo* e casuale. Infatti, 14K emergeva ripetutamente ed esclusivamente dall'ultima diluizione del campione detectabile in Western Blot dopo amplificazione *in vitro*, come se soltanto una situazione di elevata diluizione dell'inoculo permettesse al conformero di propagarsi, indicando quindi una origine non casuale. Infine, è possibile che 14K fosse già presente nell'isolato naturale di Scrapie e che, in accordo con la teoria a quasi-specie di Collinge e Weissmann (*Collinge & Clarke 2007; Weissmann 2011*), il ceppo di Scrapie fosse composto da un insieme di differenti conformeri di PrP<sup>Sc</sup> mantenuti sotto la pressione selettiva dell'ospite. Quindi modificando l'ambiente di replicazione, e conseguentemente la pressione selettiva, il conformero 14K, benché meno competitivo del conformero maggioritario 18K, è stato selezionato e propagato. In questo contesto, l'emergenza del mutante solo in reazioni di amplificazione che sono indotte da quantità minime di prioni suggerisce l'ipotesi che questo derivi da una perdita della variabilità conformazionale dell'inoculo originario, a causa del basso numero di particelle che hanno dato origine alla replicazione, e che l'evoluzione sia stata guidata in direzione sempre più divergente dall'originale attraverso successivi passaggi limitanti (colli di bottiglia), fino all'emergenza del conformero mutante dopo numerosi passaggi. Questa conclusione è in accordo all'ipotesi che le popolazioni di prioni, in un dato isolato, si comportino come le quasi-specie virali (*Domingo et al., 2012*).

La natura quasi-specie dei ceppi di prioni prevede che la mutabilità sia una intrinseca proprietà dei prioni, che agisce anche durante repliche omologhe e in assenza di forti limiti selettivi, quali mismatches nella sequenza primaria della PrP, modifiche della PrP<sup>C</sup> o dell'ambiente replicativo. In questo scenario, tecnologia chiave si è dimostrata essere il PMCA, tecnologia che permette di seguire la popolazione per un elevato numero di repliche in un periodo di tempo molto più breve di quanto sarebbe necessario *in vivo*. Nel prosieguo del nostro lavoro abbiamo sfruttato queste proprietà in modo da seguire l'evoluzione di popolazioni prioniche replicate secondo differenti regimi di popolazione, assimilabili ai passaggi ad alta e a bassa molteplicità d'infezione in uso per lo studio dell'evoluzione virale. Come read-out per l'identificazione degli eventuali mutanti conformazionali di PrP<sup>Sc</sup> è stata utilizzata una tecnica di tipizzazione della PrP<sup>res</sup>, della quale sono stati precedentemente dimostrati velocità e riproducibilità nella rivelazione anche di piccolissimi cambiamenti nel sito di taglio della PrP riconosciuto dalla Proteinasi



K. Chiaramente, una tipizzazione di questo tipo sottostima il numero delle possibili ed esistenti varianti prioniche, poichè riconosce esclusivamente varianti prioniche nelle quali il cambiamento conformazionale implica uno spostamento del sito di taglio riconosciuto dalla PK e quindi uno shift nel peso molecolare della PrP<sup>res</sup>. Nonostante questo, in una popolazione su cinque in entrambi i ceppi di prioni analizzati è stata osservata l'emergenza di varianti conformazionali della PrP<sup>Sc</sup>. Queste varianti conformazionali risultavano positivamente selezionate come nuova popolazione dominante del ceppo, come nel caso di v586/a, oppure in un equilibrio dinamico con numerose altre varianti, come per SS21/a. In entrambi i casi, però, le popolazioni "mutanti" emergevano dopo un numero di repliche relativamente breve, cioè dopo due sole propagazioni attraverso passaggi ad ampie popolazioni. Invece, nessuna variazione conformazionale è stata osservata nelle sei popolazioni sottoposte ad eventi a collo di bottiglia, nonostante queste fossero caratterizzate da un elevato numero di repliche *in vitro* (oltre 10<sup>24</sup> per la popolazione SS21/c). Questi risultati potrebbero suggerire che le due varianti conformazionali identificate fossero entrambe presenti come sottopopolazione minoritaria dei due ceppi, selezionate positivamente e quindi amplificate fino a diventare la popolazione dominante *in vitro* dopo passaggi ad ampie popolazioni, e invece perse con la drastica riduzione del numero delle molecole di PrP<sup>Sc</sup> che avviano la replicazione dovuta agli eventi a collo di bottiglia. I ripetuti cambiamenti conformazionali osservati nella popolazione SS21/a potrebbero essere la prova della presenza di un equilibrio dinamico tra due prevalenti sottopopolazioni conformazionali di PrP<sup>Sc</sup>, la cui fluttuante emergenza potrebbe essere dovuta ad una incontrollata variazione delle condizioni sperimentali. Una spiegazione alternativa e meno realistica prevedrebbe di considerare la replicazione dei prioni che avviene *in vitro* in PMCA estremamente propensa all'errore, così da permettere l'emergenza di mutazioni e la successiva selezione dei conformeri mutati dopo pochi cicli di replicazione. Una ipotesi di questo tipo, si troverebbe però confutata dalla moltitudine di evidenze sperimentali a dimostrazione dell'abilità del PMCA di mimare la biologia della replicazione dei prioni (Shikiya et al., 2014; Levavasseur et al., 2014; Morales et al., 2012). Negli studi di evoluzione virale è stato ripetutamente osservato che le quasi-specie virali propagate ad alta molteplicità d'infezione mostrino un aumento della fitness virale, che può essere accompagnata o meno da una modificazione della sequenza consensus e quindi dall'emergenza di un mutante; al contrario, un regime di replicazione che prevede successivi eventi a collo di bottiglia determina un decremento di fitness accompagnato da un accumulo di mutazioni spesso difettive (Domingo et al., 2012; Ojosnegros et al., 2011). Anche se varianti conformazionali di PrP<sup>Sc</sup> non sono state riscontrate, un notevole

decremento del tasso di amplificazione *in vitro* è stato osservato in tutte le popolazioni di prioni sottoposte a eventi a collo di bottiglia. Infatti, due delle tre popolazioni originate da SS21 sono state perse dopo 5 rounds di PMCA, e la terza, pur continuando a replicare, mostrava un decremento del tasso di replicazione di circa 100 volte rispetto all'originale, supportando quindi la presenza di un generalizzato decremento di fitness nelle popolazioni soggette ad amplificazioni *in vitro* e sottoposte a continui eventi a collo di bottiglia. Invece, SS21/a e b, popolazioni propagate attraverso ampi passaggi di popolazione, mantenevano un tasso di amplificazione *in vitro*, e quindi una fitness, elevato. Quindi, nello scenario delle quasi-specie, le popolazioni prioniche che si propagano a partire da un grande numero di unità replicative potrebbero andare incontro a un rapido accumulo di varianti conformazionali, alcune delle quali in grado di superare il conformero originale perchè selezionate positivamente *in vitro*, come accaduto per SS21/a e v587/a. Al contrario, eventi a collo di bottiglia diminuirebbero il numero di varianti conformazionali della popolazione fondatrice, aumentando così le possibilità che possano essere selezionate varianti difettive, fino ad arrivare alla perdita della popolazione stessa. Una teoria di questo tipo spiegherebbe contestualmente anche l'emergenza del mutante 14K: difettivo perchè incapace di replicare *in vivo* e caratterizzato da una fitness mediocre *in vitro*, e originato dopo consecutivi rounds in PMCA a partire da un inoculo estremamente diluito, cioè, come riportato per popolazioni sottoposte ad eventi a collo di bottiglia, da un piccolo numero di unità replicative. La dimostrata emergenza di varianti conformazionali di PrP<sup>Sc</sup> durante replicazioni *in vitro* in assenza di cambiamenti dell'ambiente di replicazione, supporta quindi l'ipotesi che la mutabilità sia una proprietà intrinseca dei ceppi di prioni, provvedendo un nuovo, e più complesso, schema interpretativo per lo studio dei ceppi di prioni. Le implicazioni di questi risultati non si limitano però alla definizione delle proprietà biologiche dei prioni, ma hanno importanti ricadute su aspetti di salute pubblica non secondari, come lo studio del potenziale zoonotico delle EST animali, con particolare riguardo a quelle contagiose come la Scrapie, nonché la comprensione del fenomeno della resistenza ai trattamenti anti-prionici.

La dinamicità dei ceppi di prioni, si rispecchia anche nella loro capacità di modificarsi in risposta a cambiamenti dell'ambiente di replicazione, come nel caso della generazione e selezione di prioni drug-resistant dopo esposizione a molecole con attività anti-prioniche (Bian *et al.*, 2014; Ghaemmaghami *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009). Questo pone degli evidenti limiti allo studio e all'uso di molecole terapeutiche, principalmente riguardo il target di azione dei futuri farmaci. In questo senso il saggio di PMCA che è stato condotto

allo scopo di discriminare molecole ad azione anti-prionica sulla base della loro abilità di inibizione dell'amplificazione *in vitro* di alcuni ceppi di prioni ha dato risultati interessanti. L'utilizzo di molecole che agiscono sulla PrP<sup>C</sup> e non sulla PrP<sup>Sc</sup> potrebbe teoricamente permettere di aggirare il problema della mutabilità dei ceppi, poiché l'azione anti-prionica agirebbe a monte della replicazione, rendendo indisponibile il substrato stesso per la crescita di nuove particelle di PrP<sup>Sc</sup>. Per questo motivo sono state sottoposte a screening esclusivamente molecole anti-prioniche con questo meccanismo di azione. L'azione inibente delle molecole selezionate è stata verificata insieme alla capacità dei prioni di mutare in risposta a molecole che non agiscono sull'agente infettante ma sull'ospite. Anche in questo caso come read-out per l'identificazione di possibili varianti conformazionali di PrP<sup>Sc</sup> emerse a seguito della replicazione di alcuni ceppi di prioni in presenza delle molecole selezionate è stata sfruttata la tecnica di tipizzazione della PrP<sup>res</sup>. La capacità inibente di ogni molecola è stata invece valutata calcolando il fattore di amplificazione del ceppo in esame in presenza della molecola, cioè l'efficienza del substrato adulterato nel convertire la PrP<sup>C</sup> in PrP<sup>Sc</sup> rispetto al substrato inalterato. Tutte le molecole analizzate, ad eccezione del Congo Rosso, mostravano un legame per la PrP<sup>C</sup> e quindi lo stesso target, ma solo due hanno mostrato una notevole capacità inibente sulla replicazione della PrP<sup>Sc</sup> *in vitro*. Tetrapirrolo e Bnf, le uniche due molecole con attività anti-prionica in PMCA, fanno entrambe parte della classe delle porfirine, il che porterebbe ad ipotizzare che abbiano in comune il meccanismo di azione e/o il sito di riconoscimento sul target. TTP e Bnf mostrano infatti una potenza, cioè la capacità di indurre un effetto ad una certa dose, ed EC50, cioè la concentrazione che genera un effetto pari al 50% dell'efficacia, comparabili. La presenza del Tetrapirrolo nel substrato della reazione di PMCA alla concentrazione di 500 µM determinava, infatti, un poderoso decremento del fattore di amplificazione dei tre ceppi di Scrapie analizzati, con valori pari a 1.3 per il ceppo di Scrapie classica italiana, 3.2 per il ceppo di Scrapie classica inglese e 1.2 per il CH1641-like. La presenza di Bnf nel substrato, determinava un effetto inibitorio simile, o addirittura superiore, mostrando valori pari a 1.6 per la Scrapie classica italiana, 1.7 per il ceppo di Scrapie classica inglese ed 0.5 per il ceppo CH1641-like. Un fattore di amplificazione pari ad 1 indica che nel campione non amplificato e nello stesso campione sottoposto ad un round di PMCA è presente una uguale quantità di PrP<sup>Sc</sup> e quindi, assenza di amplificazione; i valori ottenuti in amplificazioni in presenza di TTP o Bnf non si discostano, almeno non significativamente, da 1, indicando quindi una quasi totale inibizione della replicazione dell'agente infettante. L'esperimento di dose-risposta condotto in PMCA sul ceppo di Scrapie classica italiana ha indicato, inoltre, come entrambe le

molecole mostrino attività di inibizione fino a concentrazioni pari 10  $\mu$ M, concentrazioni ragionevoli per eventuali saggi *ex vivo* e *in vivo*. Tra le altre molecole analizzate, la sola molecola SM84 mostrava un parziale effetto inibitorio sulla replicazione *in vitro* dei prioni. La solubilizzazione di SM84 in DMSO, però, rende poco significativo il risultato ottenuto, data l'evidente azione inibitoria del DMSO stesso sulla efficienza di conversione della PrP<sup>C</sup> in PrP<sup>Sc</sup> *in vitro*. Il DMSO è un composto organico polare, capace di agire da accettore nella formazione di legami a idrogeno, con struttura piccola e compatta, una combinazione di proprietà queste che sfociano nell'abilità del composto di associarsi con molecole di acqua, zuccheri, acidi nucleici, sostanze ioniche e proteine. E' quindi possibile che questa aspecifica capacità di legame possa parzialmente interferire, direttamente o anche indirettamente attraverso il sequestro di componenti accessori, nella replicazione dei prioni *in vitro*. In nessuno degli esperimenti preliminari condotti è stata però evidenziata l'emergenza di varianti conformazionali della PrP<sup>Sc</sup>. Questo non implica ancora che tali trattamenti sarebbero scevri dal fenomeno della resistenza. Infatti, per dimostrare l'incapacità dei prioni di mutare in risposta a trattamenti farmacologici, sarebbe necessario sottoporre il ceppo di Scrapie utilizzato nello screening a successive amplificazioni *in vitro* in presenza di TTP e/o Bnf, mimando così l'adattamento dell'agente infettante alla nuova condizione replicativa. Considerata però la totale incapacità della PrP<sup>Sc</sup> di transconformare molecole di PrP<sup>C</sup> in presenza delle due porfirine, replicazioni consecutive in PMCA non permetterebbero alcun adattamento, in quanto la necessaria diluizione del prodotto amplificato in esperimenti di PMCA seriali andrebbe a diluire le eventuali e esigue molecole di PrP<sup>Sc</sup> amplificate *in vitro*, portando così alla perdita della popolazione prionica. In questo scenario, quindi, tanto il Tetrapirrolo quanto la porfirina Bnf si confermerebbero efficienti molecole ad azione anti-prionica, ribadendo come la PrP<sup>C</sup> sia un valido e alternativo target farmacologico nella terapia delle EST, anche in considerazione della mutabilità dei ceppi di prioni.

## 6. CONCLUSIONI

La fedele riproduzione della biologia dei prioni attraverso il PMCA, ha designato questa tecnica a strumento utilizzabile per la diagnosi, per la valutazione dei determinanti molecolari alla base della suscettibilità genetica degli ovini a diversi agenti di EST e del potenziale zoonotico, per lo studio dei meccanismi alla base della propagazione di questo inusuale agente infettivo (*Kurt et al., 2007; Bucalossi et al., 2011; Krejciova et al., 2014; Deleault et al., 2012*), e, recentemente, anche per lo studio della mutabilità dei ceppi (*Gonzalez-Montalban et al., 2013; Vanni et al., 2014*). I dati ottenuti in questo studio appoggiano, in accordo con quanto riportato in letteratura, l'ipotesi che i ceppi di prioni, strutturati come una quasi-specie, siano capaci di andare incontro ad eventi di selezione e mutazione, anche in assenza di un agente "mutageno", e possano essere studiati facendo riferimento ai meccanismi evolutivi "darwiniani" propri delle popolazioni di patogeni classici. I risultati della tesi evidenziano con forza come la mutabilità sia una proprietà intrinseca della Scrapie. Questa caratteristica ben si coniuga con le evidenze storiche della mutabilità e variabilità dei ceppi di Scrapie. E' evidente come una popolazione caratterizzata da variabilità contenga in sé una maggiore capacità di adattarsi, il che potrebbe offrire anche una spiegazione alle caratteristiche biologiche ed epidemiologiche della Scrapie, che come noto è contagiosa, si propaga in individui con diverse sequenze aminoacidiche della PrP<sup>C</sup>, e colonizza diversi distretti tissutali prima di raggiungere il sistema nervoso centrale dove esplica la sua azione patogena.

Alla luce dei risultati ottenuti, è anche chiaro come questa intrinseca capacità di ceppi di prioni di mutare abbia un impatto notevole su alcuni aspetti di sanità pubblica, soprattutto considerando la nostra incapacità di controllare *a priori* questo fenomeno. Fino ad oggi l'unica EST a dimostrato potenziale zoonotico è la BSE, ma nuove evidenze stanno emergendo a sostegno del potenziale zoonotico della Scrapie ovina (*Cassard et al., 2014*). Chiaramente, con l'evidenza della capacità dell'agente infettante di andare incontro a mutazione, andrebbe rivalutato il rischio per l'uomo di quelle EST considerate ad oggi di minore importanza zoonotica ma endemiche, come Scrapie o Chronic Wasting Disease.

Infine, la stessa mutabilità sembra porre limiti allo sviluppo e all'uso di molecole terapeutiche, principalmente nel caso delle EST umane. Nell'ambito di questo contesto, e considerati i risultati ottenuti, questo studio ha confermato inoltre come il PMCA possa essere un valido strumento per lo screening di molecole terapeutiche, capace anche di valutarne la capacità di inibizione su diversi ceppi di prioni, ma soprattutto suggerisce

come la PrP<sup>C</sup> possa essere un target farmacologico alternativo nella terapia delle EST, potenzialmente in grado anche di aggirare il problema della mutabilità dei ceppi.

## PUBBLICAZIONI

- “Detection of *Giardia duodenalis* assemblages A and B in human feces by simple, assemblage-specific PCR assays” Vanni L, Cacciò S.M., van Lith L., Lebbad M., Svärd S.G., Pozio E., Tosini F., PLoS Negl Trop Dis. 2012;6(8):e1776.
- “*In vitro* replication highlights the mutability of prions” Vanni L, Di Bari M.A., Pirisinu L., D’Agostino C., Agrimi U., Nonno R., Prion 2014 Jan 1;8(1):154-60.

## BIBLIOGRAFIA

- Alper T. Scrapie agent unlike viruses in size and susceptibility to inactivation by ionizing or ultraviolet radiation. Nature. 1985 Oct 24-30;317(6039):750.
- Asante EA, Linehan JM, Desbruslais M, Joiner S, Gowland I, Wood AL, Welch J, Hill AF, Lloyd SE, Wadsworth JD, Collinge J. BSE prions propagate as either variant CJD-like or sporadic CJD-like prion strains in transgenic mice expressing human prion protein. EMBO J. 2002 Dec 2;21(23):6358-66.
- Baral PK, Swayampakula M, Rout MK, Kav NN, Spyropoulos L, Aguzzi A, James MN. Structural basis of prion inhibition by phenothiazine compounds. Structure. 2014 Feb 4;22(2):291-303.
- Benestad SL, Arsac JN, Goldmann W, Nöremark M. Atypical/Nor98 scrapie: properties of the agent, genetics, and epidemiology. Vet Res. 2008 Jul-Aug;39(4):19
- Benito-León J. Combined quinacrine and chlorpromazine therapy in fatal familial insomnia. Clin Neuropharmacol. 2004 Jul-Aug;27(4):201-3.
- Béringue V, Herzog L, Jaumain E, Reine F, Sibille P, Le Dur A, Vilotte JL, Laude H. Facilitated cross-species transmission of prions in extraneural tissue. Science. 2012 Jan 27;335(6067):472-5.
- Bessen RA, Marsh RF. Identification of two biologically distinct strains of transmissible mink encephalopathy in hamsters. J Gen Virol. 1992 Feb;73 ( Pt 2):329-34.
- Bessen RA, Marsh RF. Biochemical and physical properties of the prion protein from two strains of the transmissible mink encephalopathy agent. J Virol. 1992 Apr;66(4):2096-101.
- Bruce ME. TSE strain variation. Br Med Bull. 2003;66:99-108.

- Bessen RA, Marsh RF. Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy. *J Virol.* 1994 Dec;68(12):7859-68
- Biacabe AG, Laplanche JL, Ryder S, Baron T. Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases. *EMBO Rep.* 2004 Jan;5(1):110-5.
- Bian J, Kang HE, Telling GC. Quinacrine promotes replication and conformational mutation of chronic wasting disease prions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Apr 22;111(16):6028-33.
- Biasini E, Harris A, Beeler A, Fluharty BR, Barreca ML, Iraci N, Ingham O., (USPTO; PCT/US2013/053796; WO/2014/025785; 13.02.2014, 2014)
- Bolton DC, McKinley MP, Prusiner SB. Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science.* 1982 Dec 24;218(4579):1309-11.
- Brown K, Mastrianni JA. The prion diseases. *J Geriatr Psychiatry Neurol.* 2010 Dec;23(4):277-98.
- Bruce ME, Fraser H. Scrapie strain variation and its implications. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1991;172:125-38.
- Bruce ME. Scrapie strain variation and mutation. *Br Med Bull.* 1993 Oct;49(4):822-38.
- Bruce M, Chree A, McConnell I, Foster J, Pearson G, Fraser H. Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice: strain variation and the species barrier. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1994 Mar 29;343(1306):405-11.
- Bruce ME. TSE strain variation. *Br Med Bull.* 2003;66:99-108.
- Bucalossi C, Cosseddu G, D'Agostino C, Di Bari MA, Chiappini B, Conte M, Rosone F, De Grossi L, Scavia G, Agrimi U, Nonno R, Vaccari G. Assessment of the genetic susceptibility of sheep to scrapie by protein misfolding cyclic amplification and comparison with experimental scrapie transmission studies. *J Virol.* 2011 Aug;85(16):8386-92.
- Bugiani O, Giaccone G, Piccardo P, Morbin M, Tagliavini F, Ghetti B. Neuropathology of Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease. *Microsc Res Tech.* 2000 Jul 1;50(1):10-5.
- Capellari S, Strammiello R, Saverioni D, Kretschmar H, Parchi P. Genetic Creutzfeldt-Jakob disease and fatal familial insomnia: insights into phenotypic variability and disease pathogenesis. *Acta Neuropathol.* 2011 Jan;121(1):21-37.



- Casalone C, Zanusso G, Acutis P, Ferrari S, Capucci L, Tagliavini F, Monaco S, Caramelli M. Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 2;101(9):3065-70.
- Cassard H, Torres JM, Lacroux C, Douet JY, Benestad SL, Lantier F, Lugan S, Lantier I, Costes P, Aron N, Reine F, Herzog L, Espinosa JC, Beringue V, Andréoletti O. Evidence for zoonotic potential of ovine scrapie prions. *Nat Commun*. 2014 Dec 16;5:5821.
- Castilla J, Saá P, Hetz C, Soto C. In vitro generation of infectious scrapie prions. *Cell*. 2005 Apr 22;121(2):195-206.
- Castilla J, Gonzalez-Romero D, Saá P, Morales R, De Castro J, Soto C. Crossing the species barrier by PrP(Sc) replication in vitro generates unique infectious prions. *Cell*. 2008 Sep 5;134(5):757-68.
- Caughey B, Ernst D, Race RE. Congo red inhibition of scrapie agent replication. *J Virol*. 1993 Oct;67(10):6270-2.
- Caughey B, Raymond GJ, Priola SA, Kocisko DA, Race RE, Bessen RA, Lansbury PT Jr, Chesebro B. Methods for studying prion protein (PrP) metabolism and the formation of protease-resistant PrP in cell culture and cell-free systems. An update. *Mol Biotechnol*. 1999 Nov;13(1):45-55.
- Chen SG, Teplow DB, Parchi P, Teller JK, Gambetti P, Autilio-Gambetti L. Truncated forms of the human prion protein in normal brain and in prion diseases. *J Biol Chem*. 1995 Aug 11;270(32):19173-80.
- Collinge J, Sidle KC, Meads J, Ironside J, Hill AF. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature*. 1996 Oct 24;383(6602):685-90.
- Collinge J. Variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet*. 1999 Jul 24;354(9175):317-23.
- Collinge J. Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annu Rev Neurosci*. 2001;24:519-50.
- Collinge J, Clarke AR. A general model of prion strains and their pathogenicity. *Science*. 2007 Nov 9;318(5852):930-6.

- Corato M, Ogliari P, Cecilian F, Cova E, Bellotti V, Cereda C, Merlini G, Ceroni M. Doxorubicin and congo red effectiveness on prion infectivity in golden Syrian hamster. *Anticancer Res.* 2009 Jul;29(7):2507-12.
- Cosseddu GM, Nonno R, Vaccari G, Bucalossi C, Fernandez-Borges N, Di Bari MA, Castilla J, Agrimi U. Ultra-efficient PrP(Sc) amplification highlights potentialities and pitfalls of PMCA technology. *PLoS Pathog.* 2011 Nov;7(11):e1002370.
- Criado JR1, Sánchez-Alavez M, Conti B, Giacchino JL, Wills DN, Henriksen SJ, Race R, Manson JC, Chesebro B, Oldstone MB. Mice devoid of prion protein have cognitive deficits that are rescued by reconstitution of PrP in neurons. *Neurobiol Dis.* 2005 Jun-Jul;19(1-2):255-65.
- Crozet C, Flamant F, Bencsik A, Aubert D, Samarut J, Baron T. Efficient transmission of two different sheep scrapie isolates in transgenic mice expressing the ovine PrP gene. *J Virol.* 2001 Jun;75(11):5328-34.
- Deleault NR, Harris BT, Rees JR, Supattapone S. Formation of native prions from minimal components in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Jun 5;104(23):9741-6. Epub 2007 May 29. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Aug 26;105(34):12636.
- Di Bari MA, Chianini F, Vaccari G, Esposito E, Conte M, Eaton SL, Hamilton S, Finlayson J, Steele PJ, Dagleish MP, Reid HW, Bruce M, Jeffrey M, Agrimi U, Nonno R. The bank vole (*Myodes glareolus*) as a sensitive bioassay for sheep scrapie. *J Gen Virol.* 2008 Dec;89(Pt 12):2975-85.
- Di Bari MA, Nonno R, Agrimi U. The mouse model for scrapie: inoculation, clinical scoring, and histopathological techniques. *Methods Mol Biol.* 2012;849:453-71.
- Di Bari MA, Nonno R, Castilla J, D'Agostino C, Pirisinu L, Riccardi G, Conte M, Richt J, Kunkle R, Langeveld J, Vaccari G, Agrimi U. Chronic wasting disease in bank voles: characterisation of the shortest incubation time model for prion diseases. *PLoS Pathog.* 2013 Mar;9(3):e1003219.
- Dickinson AG. Scrapie in sheep and goats. *Front Biol.* 1976;44:209-41.
- Domingo E, Sheldon J, Perales C. Viral quasispecies evolution. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2012 Jun;76(2):159-216.
- Fernández-Borges N, de Castro J, Castilla J. In vitro studies of the transmission barrier. *Prion.* 2009 Oct-Dec;3(4):220-3.

- Fraser H, Dickinson AG. Scrapie in mice. Agent-strain differences in the distribution and intensity of grey matter vacuolation. *J Comp Pathol.* 1973 Jan;83(1):29-40
- Gajdusek DC, Gibbs CJ Jr, Asher DM, Brown P, Diwan A, Hoffman P, Nemo G, Rohwer R, White L. Precautions in medical care of, and in handling materials from, patients with transmissible virus dementia (Creutzfeldt-Jakob disease). *N Engl J Med.* 1977 Dec 8;297(23):1253-8.
- Gambetti P, Puoti G, Zou WQ. Variably protease-sensitive prionopathy: a novel disease of the prion protein. *J Mol Neurosci.* 2011 Nov;45(3):422-4.
- Ghaemmaghami S, Ahn M, Lessard P, Giles K, Legname G, DeArmond SJ, Prusiner SB. Continuous quinacrine treatment results in the formation of drug-resistant prions. *PLoS Pathog.* 2009 Nov;5(11):e1000673.
- Goldman W. PrP genetics in ruminant transmissible spongiform encephalopathies. *Vet Res.* 2008 Jul-Aug;39(4):30.
- Gonzalez-Montalban N, Baskakov IV. Assessment of strain-specific PrP(Sc) elongation rates revealed a transformation of PrP(Sc) properties during protein misfolding cyclic amplification. *PLoS One.* 2012;7(7):e41210.
- Gonzalez-Montalban N, Lee YJ, Makarava N, Savtchenko R, Baskakov IV. Changes in prion replication environment cause prion strain mutation. *FASEB J.* 2013 Sep;27(9):3702-10.
- Green KM, Castilla J, Seward TS, Napier DL, Jewell JE, Soto C, Telling GC. Accelerated high fidelity prion amplification within and across prion species barriers. *PLoS Pathog.* 2008 Aug 29;4(8):e1000139.
- Griffith JS. Self-replication and scrapie. *Nature.* 1967 Sep 2;215(5105):1043-4.
- Haley NJ, Seelig DM, Zabel MD, Telling GC, Hoover EA. Detection of CWD prions in urine and saliva of deer by transgenic mouse bioassay. *PLoS One.* 2009;4(3):e4848.
- Hill AF, Desbruslais M, Joiner S, Sidle KC, Gowland I, Collinge J, Doey LJ, Lantos P. The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature.* 1997 Oct 2;389(6650):448-50, 526.
- Hill AF, Joiner S, Beck JA, Campbell TA, Dickinson A, Poulter M, Wadsworth JD, Collinge J. Distinct glycoform ratios of protease resistant prion protein associated with PRNP point mutations. *Brain.* 2006 Mar;129(Pt 3):676-85.

- Hosszu LL, Jackson GS, Trevitt CR, Jones S, Batchelor M, Bhelt D, Prodromidou K, Clarke AR, Waltho JP, Collinge J. The residue 129 polymorphism in human prion protein does not confer susceptibility to Creutzfeldt-Jakob disease by altering the structure or global stability of PrPC. *J Biol Chem.* 2004 Jul 2;279(27):28515-21.
- Istituto Superiore di Sanità discriminatory Western blot; Community Reference Laboratory of the European Union: TSE strain characterization in small ruminants—a technical handbook for national reference laboratories in the EU. 174 Version 4, January 2010. [http://www.defra.gov.uk/vla/science/docs/sci\\_tse\\_rl\\_handbookv4jan10.pdf](http://www.defra.gov.uk/vla/science/docs/sci_tse_rl_handbookv4jan10.pdf)
- Jacobs JG, Langeveld JP, Biacabe AG, Acutis PL, Polak MP, Gavier-Widen D, Buschmann A, Caramelli M, Casalone C, Mazza M, Groschup M, Erkens JH, Davidse A, van Zijderveld FG, Baron T. Molecular discrimination of atypical bovine spongiform encephalopathy strains from a geographical region spanning a wide area in Europe. *J Clin Microbiol.* 2007 Jun;45(6):1821-9.
- Jarrett JT, Lansbury PT Jr. Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell.* 1993 Jun 18;73(6):1055-8.
- Jones M, Wight D, Barron R, Jeffrey M, Manson J, Prowse C, Ironside JW, Head MW. Molecular model of prion transmission to humans. *Emerg Infect Dis.* 2009 Dec;15(12):2013-6.
- Katorcha E, Makarava N, Savtchenko R, D'Azzo A, Baskakov IV. Sialylation of prion protein controls the rate of prion amplification, the cross-species barrier, the ratio of PrP<sup>Sc</sup> glycoform and prion infectivity. *PLoS Pathog.* 2014 Sep 11;10(9):e1004366.
- Kimberlin RH, Walker CA. Evidence that the transmission of one source of scrapie agent to hamsters involves separation of agent strains from a mixture. *J Gen Virol.* 1978 Jun;39(3):487-96.
- Kimberlin RH, Cole S, Walker CA. Temporary and permanent modifications to a single strain of mouse scrapie on transmission to rats and hamsters. *J Gen Virol.* 1987 Jul;68 ( Pt 7):1875-81.
- Kimberlin RH, Walker CA, Fraser H. The genomic identity of different strains of mouse scrapie is expressed in hamsters and preserved on reisolation in mice. *J Gen Virol.* 1989 Aug;70 ( Pt 8):2017-25.

- King CY, Diaz-Avalos R. Protein-only transmission of three yeast prion strains. *Nature*. 2004 Mar 18;428(6980):319-23.
- Klöhn PC, Stoltze L, Flechsig E, Enari M, Weissmann C. A quantitative, highly sensitive cell-based infectivity assay for mouse scrapie prions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Sep 30;100(20):11666-71.
- Korth C, May BC, Cohen FE, Prusiner SB. Acridine and phenothiazine derivatives as pharmacotherapeutics for prion disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Aug 14;98(17):9836-41.
- Krejciova Z, Barria MA, Jones M, Ironside JW, Jeffrey M, González L, Head MW. Genotype-dependent molecular evolution of sheep bovine spongiform encephalopathy (BSE) prions in vitro affects their zoonotic potential. *J Biol Chem*. 2014 Sep 19;289(38):26075-88.
- Kuczius T, Groschup MH. Differences in proteinase K resistance and neuronal deposition of abnormal prion proteins characterize bovine spongiform encephalopathy (BSE) and scrapie strains. *Mol Med*. 1999 Jun;5(6):406-18.
- Kurt TD, Perrott MR, Wilusz CJ, Wilusz J, Supattapone S, Telling GC, Zabel MD, Hoover EA. Efficient in vitro amplification of chronic wasting disease PrPRES. *J Virol*. 2007 Sep;81(17):9605-8.
- Legname G, Baskakov IV, Nguyen HO, Riesner D, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB. Synthetic mammalian prions. *Science*. 2004 Jul 30;305(5684):673-6.
- Levavasseur E, Privat N, Martin JC, Simoneau S, Baron T, Flan B, Torres JM, Haïk S. Molecular modeling of prion transmission to humans. *Viruses*. 2014 Oct 2;6(10):3766-77.
- Li J, Browning S, Mahal SP, Oelschlegel AM, Weissmann C. Darwinian evolution of prions in cell culture. *Science*. 2010 Feb 12;327(5967):869-72.
- Lloyd SE, Linehan JM, Desbruslais M, Joiner S, Buckell J, Brandner S, Wadsworth JD, Collinge J. Characterization of two distinct prion strains derived from bovine spongiform encephalopathy transmissions to inbred mice. *J Gen Virol*. 2004 Aug;85(Pt 8):2471-8.
- Lobão-Soares B, Walz R, Carlotti CG Jr, Sakamoto AC, Calvo F, Terzian AL, da Silva JA, Wichert-Ana L, Coimbra NC, Bianchin MM. Cellular prion protein regulates the motor behaviour performance and anxiety-induced responses in genetically modified mice. *Behav Brain Res*. 2007 Oct 1;183(1):87-94.

- Maddison BC, Rees HC, Baker CA, Taema M, Bellworthy SJ, Thorne L, Terry LA, Gough KC. Prions are secreted into the oral cavity in sheep with preclinical scrapie. *J Infect Dis.* 2010 Jun 1;201(11):1672-6.
- Mahal SP, Baker CA, Demczyk CA, Smith EW, Julius C, Weissmann C. Prion strain discrimination in cell culture: the cell panel assay. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Dec 26;104(52):20908-13.
- Makarava N, Savtchenko R, Baskakov IV. Selective amplification of classical and atypical prions using modified protein misfolding cyclic amplification. *J Biol Chem.* 2013 Jan 4;288(1):33-41.
- Massimino ML, Redaelli M, Bertoli A, Sorgato MC, Mucignat-Caretta C. Altered behavioral aspects of aged mice lacking the cellular prion protein. *Physiol Behav.* 2013 Jul 2;119:86-91.
- Mays CE, Yeom J, Kang HE, Bian J, Khaychuk V, Kim Y, Bartz JC, Telling GC, Ryou C. In vitro amplification of misfolded prion protein using lysate of cultured cells. *PLoS One.* 2011 Mar 28;6(3):e18047.
- McKinley MP, Bolton DC, Prusiner SB. A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell.* 1983 Nov;35(1):57-62.
- Meyer RK, McKinley MP, Bowman KA, Braunfeld MB, Barry RA, Prusiner SB. Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 Apr;83(8):2310-4.
- Migliore S, Esposito E, Pirisinu L, Marcon S, Di Bari M, D'Agostino C, Chiappini B, Conte M, Sezzi E, De Grossi L, Agrimi U, Vaccari G, Nonno R. Effect of PrP genotype and route of inoculation on the ability of discriminatory Western blot to distinguish scrapie from sheep bovine spongiform encephalopathy. *J Gen Virol.* 2012 Feb;93(Pt 2):450-5.
- Moda F, Gambetti P, Notari S, Concha-Marambio L, Catania M, Park KW, Maderna E, Suardi S, Haik S, Brandel JP, Ironside J, Knight R, Tagliavini F, Soto C. Prions in the urine of patients with variant Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med.* 2014 Aug 7;371(6):530-9.
- Morales R, Duran-Aniotz C, Diaz-Espinoza R, Camacho MV, Soto C. Protein misfolding cyclic amplification of infectious prions. *Nat Protoc.* 2012 Jun 28;7(7):1397-409.
- Mulcahy ER, Bessen RA. Strain-specific kinetics of prion protein formation in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* 2004 Jan 16;279(3):1643-9.

- Murayama Y, Yoshioka M, Yokoyama T, Iwamaru Y, Imamura M, Masujin K, Yoshiba S, Mohri S. Efficient in vitro amplification of a mouse-adapted scrapie prion protein. *Neurosci Lett.* 2007 Feb 21;413(3):270-3.
- Nicoll AJ, Trevitt CR, Tattum MH, Risse E, Quarterman E, Ibarra AA, Wright C, Jackson GS, Sessions RB, Farrow M, Waltho JP, Clarke AR, Collinge J. Pharmacological chaperone for the structured domain of human prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Oct 12;107(41):17610-5.
- Nonno R, Di Bari MA, Cardone F, Vaccari G, Fazzi P, et al. (2006) Efficient Transmission and Characterization of Creutzfeldt–Jakob Disease Strains in Bank Voles. *PLoS Pathog* 2: 12.
- Oesch B, Westaway D, Wälchli M, McKinley MP, Kent SB, Aebersold R, Barry RA, Tempst P, Teplow DB, Hood LE, et al. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell.* 1985 Apr;40(4):735-46.
- Ojosnegros S, Perales C, Mas A, Domingo E. Quasispecies as a matter of fact: viruses and beyond. *Virus Res.* 2011 Dec;162(1-2):203-15. doi: 10.1016/j.virusres.2011.09.018.
- Orgel LE. Prion replication and secondary nucleation. *Chem Biol.* 1996 Jun;3(6):413-4.
- Orsi A, Sitia R. Interplays between covalent modifications in the endoplasmic reticulum increase conformational diversity in nascent prion protein. *Prion.* 2007 Oct;1(4):236-42.
- Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, Mehlhorn I, Huang Z, Fletterick RJ, Cohen FE, et al. Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Dec 1;90(23):10962-6.
- Parchi P, Petersen RB, Chen SG, Autilio-Gambetti L, Capellari S, Monari L, Cortelli P, Montagna P, Lugaresi E, Gambetti P. Molecular pathology of fatal familial insomnia. *Brain Pathol.* 1998 Jul;8(3):539-48.
- Pattison IH, Millison GC. Scrapie produced experimentally in goats with special reference to the clinical syndrome. *J Comp Pathol.* 1961 Apr;71:101-9.
- Pattison IH. RESISTANCE OF THE SCRAPIE AGENT TO FORMALIN. *J Comp Pathol.* 1965 Apr;75:159-64.

- Peretz D, Scott MR, Groth D, Williamson RA, Burton DR, Cohen FE, Prusiner SB. Strain-specified relative conformational stability of the scrapie prion protein. *Protein Sci.* 2001 Apr;10(4):854-63.
- Peretz D, Williamson RA, Legname G, Matsunaga Y, Vergara J, Burton DR, DeArmond SJ, Prusiner SB, Scott MR. A change in the conformation of prions accompanies the emergence of a new prion strain. *Neuron.* 2002 Jun 13;34(6):921-32.
- Pirisinu L, Di Bari M, Marcon S, Vaccari G, D'Agostino C, Fazzi P, Esposito E, Galeno R, Langeveld J, Nonno R, Agrimi U. A new method for the characterization of strain-specific conformational stability of protease-sensitive and protease-resistant prp. *PLoS One.* 2010;5:e12723.
- Pirisinu L, Migliore S, Di Bari MA, Esposito E, Baron T, D'Agostino C, De Grossi L, Vaccari G, Agrimi U, Nonno R. Molecular discrimination of sheep bovine spongiform encephalopathy from scrapie. *Emerg Infect Dis.* 2011 Apr;17(4):695-8.
- Pirisinu L, Marcon S, Di Bari MA, D'Agostino C, Agrimi U, Nonno R. Biochemical characterization of prion strains in bank voles. *Pathogens.* 2013 Jul 2;2(3):446-56.
- Polymenidou M, Stoeck K, Glatzel M, Vey M, Bellon A, Aguzzi A. Coexistence of multiple PrP<sup>Sc</sup> types in individuals with Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet Neurol.* 2005 Dec;4(12):805-14. Erratum in: *Lancet Neurol.* 2005 Dec;4(12):795.
- Prusiner SB. Novel proteinacious Infectious Particles Cause Scrapie. *Science.* 1982 Apr 9;216(4542):136-144.
- Prusiner SB. Molecular biology of prion diseases. *Science.* (1991). 252, 1515-1522.
- Prusiner SB. Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (1998). 95, 13363-13383.
- Prusiner SB, Scott MR, DeArmond SJ, Cohen FE. Prion protein biology. *Cell.* 1998 May 1;93(3):337-48.
- Rial D, Piermartiri TC, Duarte FS, Tasca CI, Walz R, Prediger RD. Overexpression of cellular prion protein (PrP(C)) prevents cognitive dysfunction and apoptotic neuronal cell death induced by amyloid- $\beta$  (A $\beta$ □□□□) administration in mice. *Neuroscience.* 2012 Jul 26;215:79-89.
- Riek R, Hornemann S, Wider G, Billeter M, Glockshuber R, Wüthrich K. NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-321). *Nature.* 1996 Jul 11;382(6587):180-2.



- Riek R, Hornemann S, Wider G, Glockshuber R, Wüthrich K. NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). *FEBS Lett.* 1997 Aug 18;413(2):282-8.
- Ross CA, Poirier MA. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med.* 2004 Jul;10 Suppl:S10-7.
- Rubenstein R, Chang B, Gray P, Piltch M, Bulgin MS, Sorensen-Melson S, Miller MW. A novel method for preclinical detection of PrPSc in blood. *J Gen Virol.* 2010 Jul;91(Pt 7):1883-92.
- Saá P, Castilla J, Soto C. Ultra-efficient replication of infectious prions by automated protein misfolding cyclic amplification. *J Biol Chem.* 2006 Nov 17;281(46):35245-52.
- Saborio GP, Permanne B, Soto C. Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature.* 2001 Jun 14;411(6839):810-3
- Safar J, Wille H, Itri V, Groth D, Serban H, Torchia M, Cohen FE, Prusiner SB. Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nat Med.* 1998 Oct;4(10):1157-65.
- Scott M, Foster D, Mirenda C, Serban D, Coufal F, Wälchli M, Torchia M, Groth D, Carlson G, DeArmond SJ, Westaway D, Prusiner SB. Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques. *Cell.* 1989 Dec 1;59(5):847-57.
- Scott MR, Will R, Ironside J, Nguyen HO, Tremblay P, DeArmond SJ, Prusiner SB. Compelling transgenic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Dec 21;96(26):15137-42.
- Shikiya RA, Eckland TE, Young AJ, Bartz JC. Prion formation, but not clearance, is supported by protein misfolding cyclic amplification. *Prion.* 2014;8(6):415-20.
- Sigurdson CJ, Manco G, Schwarz P, Liberski P, Hoover EA, Hornemann S, Polymenidou M, Miller MW, Glatzel M, Aguzzi A. Strain fidelity of chronic wasting disease upon murine adaptation. *J Virol.* 2006 Dec;80(24):12303-11.
- Soto C, Anderes L, Suardi S, Cardone F, Castilla J, Frossard MJ, Peano S, Saa P, Limido L, Carbonatto M, Ironside J, Torres JM, Pocchiari M, Tagliavini F. Pre-symptomatic detection of prions by cyclic amplification of protein misfolding. *FEBS Lett.* 2005 Jan 31;579(3):638-42.

- Stack MJ, Chaplin MJ, Clark J Differentiation of prion protein glycoforms from naturally occurring sheep scrapie, sheep-passaged scrapie strains (ch1641 and sspb1), bovine spongiform encephalopathy (bse) cases and romney and cheviot breed sheep experimentally inoculated with bse using two monoclonal antibodies. *Acta Neuropathol.* 2002;104:279–286.
- Steele AD, Lindquist S, Aguzzi A. The prion protein knockout mouse: a phenotype under challenge. *Prion.* 2007 Apr-Jun;1(2):83-93.
- Supattapone S. Biochemistry. What makes a prion infectious? *Science.* 2010 Feb 26;327(5969):1091-2.
- Tanaka M, Chien P, Naber N, Cooke R, Weissman JS. Conformational variations in an infectious protein determine prion strain differences. *Nature.* 2004 Mar 18;428(6980):323-8.
- Tanaka M, Collins SR, Toyama BH, Weissman JS. The physical basis of how prion conformations determine strain phenotypes. *Nature.* 2006 Aug 3;442(7102):585-9.
- Tattum MH, Jones S, Pal S, Collinge J, Jackson GS. Discrimination between prion-infected and normal blood samples by protein misfolding cyclic amplification. *Transfusion.* 2010 May;50(5):996-1002.
- Telling GC, Parchi P, DeArmond SJ, Cortelli P, Montagna P, Gabizon R, Mastrianni J, Lugaresi E, Gambetti P, Prusiner SB. Evidence for the conformation of the pathologic isoform of the prion protein enciphering and propagating prion diversity. *Science.* 1996 Dec 20;274(5295):2079-82.
- Thorne L, Terry LA. In vitro amplification of PrPSc derived from the brain and blood of sheep infected with scrapie. *J Gen Virol.* 2008 Dec;89(Pt 12):3177-84.
- Vanni I, Di Bari MA, Pirisinu L, D'Agostino C, Agrimi U, Nonno R. In vitro replication highlights the mutability of prions. *Prion.* 2014 Jan-Feb;8(1):154-60.
- Wadsworth JD, Asante EA, Desbruslais M, Linehan JM, Joiner S, Gowland I, Welch J, Stone L, Lloyd SE, Hill AF, Brandner S, Collinge J. Human prion protein with valine 129 prevents expression of variant CJD phenotype. *Science.* 2004 Dec 3;306(5702):1793-6.
- Wang F, Wang X, Yuan CG, Ma J. Generating a prion with bacterially expressed recombinant prion protein. *Science.* 2010 Feb 26;327(5969):1132-5.
- Weissmann C, Li J, Mahal SP, Browning S. Prions on the move. *EMBO Rep.* 2011 Oct 28;12(11):1109-17.

- Wickner RB, Shewmaker FP, Bateman DA, Edskes HK, Gorkovskiy A, Dayani Y, Bezsonov EE. Yeast Prions: Structure, Biology, and Prion-Handling Systems. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2015 Mar;79(1):1-17.
- Yokoyama T, Masujin K, Schmerr MJ, Shu Y, Okada H, Iwamaru Y, Imamura M, Matsuura Y, Murayama Y, Mohri S. Intraspecies prion transmission results in selection of sheep scrapie strains. *PLoS One.* 2010 Nov 16;5(11):e15450.
- Zou WQ, Puoti G, Xiao X, Yuan J, Qing L, Cali I, Shimoji M, Langeveld JP, Castellani R, Notari S, Crain B, Schmidt RE, Geschwind M, Dearmond SJ, Cairns NJ, Dickson D, Honig L, Torres JM, Mastrianni J, Capellari S, Giaccone G, Belay ED, Schonberger LB, Cohen M, Perry G, Kong Q, Parchi P, Tagliavini F, Gambetti P. Variably protease-sensitive prionopathy: a new sporadic disease of the prion protein. *Ann Neurol.* 2010 Aug;68(2):162-72.

## **RINGRAZIAMENTI**

Questa tesi di dottorato è il frutto del lavoro svolto negli ultimi tre anni presso il Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare dell'Istituto Superiore di Sanità. Tre anni di accrescimento professionale e umano, fatti di un alternarsi di successi ed insuccessi, ma pur sempre affrontati col sorriso e la determinazione. D'altronde questa è la Scienza.

Un ringraziamento particolare va al mio supervisore Dott. Romolo Nonno, che mi ha accompagnata in questa strada "prionica" tanto affascinante quanto impervia. Tragitto durante il quale non ho mai vacillato, grazie alla sua disponibilità, (tanta) pazienza ed esperienza. Possedere almeno un pò del suo senso critico e della sua passione sarebbe per me una grande soddisfazione. Ringrazio inoltre il Dott. Umberto Agrimi, che nonostante i tanti impegni è sempre stato presente, dispensando consigli e suggerimenti.

Vorrei ringraziare il Professor Poglayen per la sua collaborazione nonostante la difficoltà della distanza.

Un ringraziamento al Dott. Roberto Chiesa e al Dott. Emiliano Biasini, senza i quali parte di questo lavoro non sarebbe stata possibile, e al Dott. David Westaway, alla Dott.ssa Nathalie Daude e a tutti i ragazzi del Centre for Prion and Protein Folding Disease per la disponibilità ed ospitalità mostratami durante il periodo trascorso nel "Great White North".

Un ringraziamento speciale ai miei colleghi, ormai cari amici, Laura Pirisinu e Stefano Marcon, con i quali ho lavorato fianco a fianco per tutto il periodo di dottorato e che nonostante i tanti impegni non hanno mai mancato di aiutarmi. Discussioni scientifiche, racconti di vita vissuta o telecronache non sono mai mancate, nemmeno quando il Mountain Standard Time sembrava creare difficoltà insormontabili.

Non posso non ringraziare il Dott. Gabriele Vaccari, che si è rivelato un grande amico, e tutto il reparto di Malattie da Prioni del Dipartimento di Sanità Pubblica e Sicurezza Alimentare dell'Istituto Superiore di Sanità: Michela Conte, Barbara Chiappini, Elena Esposito, Michele Angelo Di Bari, Geraldina Riccardi, Claudia D'Agostino, Paolo Frassanito, Paola Fazzi, Luisella Morelli e Alfredo Caggiano.

Un grande grazie anche a Stefano, Rosy, Antonella, Laura e Valeria, fantastici sempre, fuori e dentro il lab. A Valeria, detentrica della medaglia d'oro dell'amicizia, un grazie speciale, perchè si prende cura di me sempre, supportandomi e sopportandomi

ogniqualevolta io ne abbia bisogno, no matter what!

Finisco ringraziando i miei più cari amici Luca ed Elena, e la mia famiglia, che mi ha incoraggiato sempre, anche a chilometri di distanza.